

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

**MARIANA LIMA PERAZZINI PEIXOTO**

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* DO FUNGO OPORTUNISTA,  
EMERGENTE, *Paecilomyces lilacinus*, AGENTE CAUSAL DA  
HIALOHIFOMICOSE, COM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS  
HUMANAS (MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS)

Rio de Janeiro

2012

**Avaliação da interação *in vitro* do fungo oportunista, emergente,  
*Paecilomyces lilacinus*, agente causal da hialohifomicose, com células  
apresentadoras de antígenos humanas (macrófagos e células dendríticas)**

**MARIANA LIMA PERAZZINI PEIXOTO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Cintia Moraes Borba  
Co-Orientadora: Dra. Dilvani Oliveira Santos.

Rio de Janeiro

2012

MARIANA LIMA PERAZZINI PEIXOTO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* DO FUNGO PORTUNISTA,  
EMERGENTE, *PAECILOMYCES LILACINUS*, AGENTE CAUSAL DA  
HIALOHIFOMICOSE, COM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS  
HUMANAS (MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Cíntia de Moraes Borba

Co-Orientadora: Dra. Dilvani Oliveira Santos

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

---

**Dra. Maria de Fátima Madeira** (Presidente)

Doutora em Ciências

Instituto Oswaldo Cruz

---

**Dra. Joseli de Oliveira Ferreira**

Doutora em Biologia Parasitária

Instituto Oswaldo Cruz

---

**Dra. Andréa Reis Bernardes de Souza Engemann**

Doutora em Ciências

Universidade Estadual do Rio de Janeiro

*Aos meus familiares e ao meu marido,  
dedico esta conquista com muito  
amor e gratidão.*

*Vocês são a minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, sei que Ele sempre irá me iluminar por qualquer caminho que eu escolha seguir.

Aos meus pais pelo amor incondicional e por terem me ensinado os caminhos do bem, do trabalho e da fé.

Aos meus familiares, não teria chegado tão longe sem a ajuda, carinho e torcida de vocês. Irmã, sobrinhas, vovô, vovó... amo muito vocês!

Ao meu marido, Leonardo, por ser meu melhor amigo, me dando força nos momentos mais difíceis e curtindo comigo ao máximo os momentos felizes. Te amo meu príncipe!

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra.Cintia M. Borba por ter estado ao meu lado em todo momento, me ensinando com muita dedicação tudo o que eu precisava aprender. Você é muito querida!

À Dra.Dilvani O. Santos pelos ensinamentos e confiança.

Às companheiras de bancada Ivy e Eloah por todo auxílio durante os experimentos na UFF, essas meninas vão longe!

À amiga de “luta” Danielly. Entramos juntas no mestrado, sofremos e sorrimos com as mesmas coisas. Obrigada por dividir tudo comigo.

Ao Prof. Dr. Maurício Verícimo do Depto. de Imunologia, Instituto de Biologia, UFF. Pela ajuda com a citometria.

Ao Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ por sua generosidade na doação de *buffy coat* para fins de pesquisa.

À Dra. Joseli de O. Ferreira e à Dra. Paula M. De Luca por toda ajuda prestada quando eu mais precisei.

À Virginia e ao Josué por toda ajuda prestada.

À toda equipe da Pós-graduação do IPEC.

Aos meus amigos por torcerem por mim e compreenderem minha ausência em vários momentos.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto Oswaldo Cruz, à Universidade Federal Fluminense, à FAPERJ e a CAPES pelo apoio financeiro.

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”*

Mahatma Gandhi

Perazzini, M L. **Avaliação da interação *in vitro* do fungo oportunista, emergente, *Paecilomyces lilacinus*, agente causal da hialohifomicose, com células apresentadoras de antígenos humanas (macrófagos e células dendríticas)**. Rio de Janeiro, 2012. 102 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

*Paecilomyces lilacinus*, um dos agentes causais da hialohifomicose, é um fungo filamentosso, assexuado. Está amplamente distribuído pelo mundo e frequentemente é encontrado como contaminante, proveniente do ar, em espécimes clínicos e em soluções consideradas estéreis. Acomete principalmente pacientes comprometidos imunologicamente, porém pacientes imunocompetentes também podem apresentar manifestações clínicas da doença, sendo esse fungo, atualmente, considerado como um importante patógeno oportunista humano. O presente trabalho teve por objetivo a investigação da interação de conídios de *P. lilacinus*, proveniente de caso clínico de hialohifomicose humana, com células apresentadoras de antígenos (APCs - macrófagos e células dendríticas). Conídios interagiram com macrófagos e células dendríticas de doadores humanos saudáveis, em diferentes concentrações (conídio/APCs) e tempos de incubação para avaliação qualitativa e quantitativa da interação por microscopia óptica e para estudo do percentual de células expressando moléculas de superfície celular que atuam na resposta imune do hospedeiro. Sobrenadantes provenientes da interação das APCs com os conídios foram coletados para o estudo das citocinas IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Os resultados demonstraram que o fungo foi capaz de infectar de modo semelhante ambas as APCs e que a concentração de 1:1 (conídio/APCs) foi a melhor proporção entre as células para avaliar o processo de fagocitose e as etapas de desenvolvimento do fungo assim como o tempo de 6 horas de interação foi o melhor tempo para a certificação da internalização dos conídios pelas APCs. Após o processo de internalização dos conídios pelas APCs os mesmos começaram a se dilatar, formar tubos germinativos e hifas septadas que se ramificaram formando um micélio que destruiu as células humanas no período de 24 horas de observação. A avaliação quantitativa da fagocitose dos conídios pelas APCs demonstrou que não houve diferenças significativas entre o percentual fagocítico dos macrófagos e células dendríticas de cada doador como também entre os doadores. A interação do fungo com as APCs na presença de L-Name não modificou o processo de desenvolvimento do conídio no interior das células humanas, quando comparado a interação das células sem L-Name. Em relação aos marcadores de superfície celular a presença dos conídios não aumentou o percentual de macrófagos expressando CD14, porém aumentou as células expressando B7.1 e DC-SIGN. As células dendríticas apresentaram um percentual semelhante de células positivas para B7.1, na ausência e presença do fungo, e um aumento significativo do percentual de células DC-SIGN positivas na presença dos conídios. Os conídios de *P. lilacinus* foram capazes de estimular a secreção da citocina IL1- $\beta$  pelos macrófagos e células dendríticas e é possível que eles tenham inibido a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos. Então, os dados aqui apresentados demonstram a capacidade invasiva para APCs e de estimulação de moléculas de superfície importantes na resposta imune do hospedeiro por *P. lilacinus*, até o momento desconhecida.

**Palavras-chave:** 1. *Paecilomyces lilacinus*. 2. Células apresentadoras de antígenos. 3. Hialohifomicose. 4. Expressão de moléculas de superfície. 5. Citocinas.



Perazzini, M L. **Evaluation of interaction *in vitro* of *Paecilomyces lilacinus*, opportunistic, emergent fungus, etiological agent of hialohyphomycosis with antigen-presenting human cells (macrophages and dendritic cells).** Rio de Janeiro, 2012. 102 f. Master [Science dissertation in Clinic Research in Infectious Diseases] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

### ABSTRACT

*Paecilomyces lilacinus* is an asexual filamentous fungus and etiological agent of hialohyphomycosis. It is widely considered cosmopolitan and frequently detected as airborne contaminant in clinical materials and sterile solutions. It is an emerging opportunistic pathogen among immunocompromised hosts but immunocompetent may present clinical manifestations of the disease. In the present study we investigated the interaction of *P. lilacinus* conidia from human hialohyphomycosis case with antigen-presenting cells (APC- macrophages and dendritic cells). Conidia interacted with APC from healthy human donors with different conidium:APC ratios and incubation times for qualitative and quantitative interaction evaluation by optical microscopy and to study of cells expressing surface molecules with play role in the host immune response. Supernatants from conidia and APC interaction were collected to detect IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokines. The results showed that this fungus was capable to infect both APC and the best conidium:APC ratio was 1:1 to evaluation the process of phagocytosis and the development of the fungus as well as the time of 6 hours of interaction was the best time to make sure that the conidia were internalized in the APCs. After the internalization process of the conidia by APC they became swollen and germ tubes were seen forming septate hypha and a mycelium that killed the APC during 24 h incubation period. The quantitative evaluation of the conidia phagocytosis by the APC showed that no significant differences were seen between macrophages and dendritic cells phagocytic percentage of each and among donors. The fungal interaction with APC in the presence of L-Name did not modify the development process of conidia inside APC, when compared with cells without L-Name. In relation to cells expressing surface molecules the presence of conidia did not increase the percentage of CD14 positive macrophages but increased these cells expressing B7.1 and DC-SIGN. The dendritic cells presented similar percentage of B7.1 positive cells in the presence and absence of the fungus and significant increase of DC-SIGN positive cells in the presence of the conidia. The *P. lilacinus* conidia were capable to stimulate the production of IL1- $\beta$  cytokine by both macrophages and dendritic cells and it is possible that the conidia have inhibited the TNF- $\alpha$  production by macrophages. Thus, the obtained data demonstrate the invasive capacity to PAC and of surface molecules stimulation important in the host immune response by *P. lilacinus*, unknown until now.

**Keywords:** 1. *Paecilomyces lilacinus*. 2. Antigen- presenting cells  
3. Hialohyphomycosis. 4. Expression of surface molecules. 5. Cytokines.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC\*- Células apresentadoras de antígenos

BSA\* – Soro albumina bovina

CDG\*- Doença granulomatosa crônica

DC\*- Célula dendrítica

DC-SIGN\*- *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

DMEM\* - Meio essencial mínimo de Dulbecco

FBS\*- Soro fetal bovino

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

HIV\*- Virus da imunodeficiência humana

I-CAM\*- Molécula de adesão intracelular

IL- Interleucina

INF- $\gamma$  - Interferon gama

iNOS\*- Óxido nítrico sintase induzível

ITS\*- *Internal trascribed spacer*

Labiopac- Laboratório de Biopatógenos e Ativação Celular

LTBBF – Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos

L-NAME- N-nitro- L-arginina- metil-éster

M $\emptyset$  - Macrófago

MEA\*- Meio de cultura a base de extrato de malte + ágar

MHC\*- Complexo principal de histocompatibilidade

MIC\*- Concentração inibitória mínima

NK\*- Célula natural *killer*

ON- Óxido nítrico

PAMPs\*- Moléculas associadas a patógenos

PBMC\*- Células mononucleares de sangue periférico

PCR\*- Reação da polimerase em cadeia

PL(S)- Isolado de *Paecilomyces lilacinus* proveniente de seio nasal

PMA\*- Phorbol myristate acetate

PRRs- Receptores de reconhecimento

Th\*- Células *T helper*

TLR\*- Receptores *toll-like*

UFF- Universidade Federal Fluminense

UFC- Unidade formadora de colônia

UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo

---

\* Abreviaturas em inglês

As unidades de medida utilizadas no texto seguem a nomenclatura do Sistema Internacional.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 1-	Esquema representativo da morfologia de <i>Paecilomyces lilacinus</i> e suas estruturas. A- Conidióforo; B- Fiálides; C- Conídios; D- <i>Stalks</i> ; (Samson, 1974).	3
Figura 2-	Fotomicrografia eletrônica de macrófago aderente derivado de sangue periférico. Fonte: <a href="http://www.uni-ulm.de/expane">www.uni-ulm.de/expane</a> (Acesso em 16/12/2011).	14
Figura 3-	Fotomicrografia eletrônica de células dendríticas derivadas de medula óssea. Fonte: Fonte: <a href="http://www.uni-ulm.de/expane">www.uni-ulm.de/expane</a> (Acesso em 16/12/2011).	16
Figura 4-	Macrocultura de <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl.S), em meio BDA, à temperatura ambiente, aos 14 dias de crescimento, apresentando (A) colônia aveludada na cor rosa e (B) reverso púrpura.	28
Figura 5-	Microcultura de <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl.S), em meio MEA, à temperatura ambiente, aos 14 dias de crescimento. Aumento original 400x; — = 10 µm.	29
Figura 6-	Microcultura de <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Pl.S), em meio MEA, à temperatura ambiente, aos 14 dias de crescimento. 1- Conidióforo; 2- Fiálide com base arredondada e pescoço fino; 3- Conídios; 4- <i>Stalk</i> .	29

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 7-	Fotomicrografia óptica (doador D2/ grupo controle) de macrófagos derivados de monócitos isolados de sangue periférico humano aos 10 dias de cultura. Coloração Giemsa. Células apresentando citoplasma expandido, com projeções em sua membrana e núcleo volumoso. Aumento original 1000x; — = 10 $\mu$ m.	31
Figura 8-	Fotomicrografia óptica (doador D2, grupo controle) de células dendríticas derivadas de monócitos isolados de sangue periférico humano e incubados com as citocinas rhGM-CSF e rhIL-4 aos 10 dias de cultura. Coloração Giemsa. Células apresentando forma alongada, com projeções citoplasmáticas formando pequenos dendritos. Aumento original 1000x; — = 10 $\mu$ m.	32
Figura 9-	Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos, doador D2, com conídios de <i>P. lilacinus</i> , concentração 2:1, por 3 horas, a 37°C. Presença de conídios fúngicos no interior de vacúolos. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 $\mu$ m.	33

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 10-	Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas, doador D2, com conídios de <i>P. lilacinus</i> , concentração 2:1, por 3 horas, a 37°C. Presença de conídios fúngicos no interior de vacúolos. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.	34
Figura 11-	Percentual de macrófagos e células dendríticas infectadas de dois doadores D1 e D2, durante interação com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , concentração 2:1, por 3 horas, a 37°C.	35
Figura 12-	Fotomicrografia óptica da interação de APCs com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , concentração 1:1, por 1 hora, a 37°C. <b>A</b> – Macrófago do doador D3 apresentando conídios no interior de vacúolos; <b>B</b> - Célula dendrítica do doador D4 com conídio do fungo internalizado ao citoplasma. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.	37
Figura 13-	Fotomicrografia óptica da interação de APCs com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , concentração 1:1, por 6 horas, a 37°C. <b>A</b> – Macrófago do doador D3 apresentando conídios dilatados no interior de vacúolos; <b>B</b> - Célula dendrítica do doador D4 com conídio no interior de vacúolo. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.	38

**Figura****Página**

- Figura 14- Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos do doador D3 com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 1:1, por 24 horas, a 37°C. Observa-se conídios dilatados; tubo germinativo; hifa septada. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm. 39
- Figura 15- Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 3:1, por 24 horas, a 37°C. **A-** Célula fagocítica do doador D3 destruída pela proliferação do micélio fúngico; **B-** Célula fagocítica do doador D4 apresentando conídio dilatado e tubo germinativo. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x;— = 10 µm. 40
- Figura 16- Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas do doador D3 com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 1:1, por 24 horas, a 37°C. Observa-se conídio dilatado com tubo germinativo. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x;— = 10 µm. 41

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 17-	Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas do doador D4 com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , concentração 3:1, por 24 horas, a 37°C. Observa-se micélio fúngico em proliferação. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x;— = 10 µm.	42
Figura 18-	Fotomicrografia óptica de APCs, doador D3, grupo controle, derivados de monócitos isolados de sangue periférico aos 10 dias de cultura. <b>A-</b> Macrófago; <b>B-</b> Célula dendrítica. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x;— = 10 µm.	43
Figura 19-	Percentual de macrófagos e células dendríticas infectadas, de dois doadores D3 e D4, durante interação com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , concentração 1:1, por 6 horas, a 37°C.	44
Figura 20-	Percentual de macrófagos e células dendríticas infectadas, de dois doadores D3 e D4, durante interação com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , concentração 3:1, por 6 horas, a 37°C	45



Figura	Página
Figura 21- Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , na concentração de 1:1 (conídio:célula), por 24 horas, a 37°C. <b>A-</b> Célula fagocítica do doador D5, na ausência de L-Name, apresentando conídios dilatados em seu interior e hifas rompendo a membrana celular; <b>B-</b> Célula fagocítica do doador D6, na ausência de L-Name, apresentando conídios dilatados, e hifas; <b>C-</b> Célula fagocítica do doador D5, na presença de L-Name, apresentando conídios dilatados; <b>D-</b> Célula fagocítica do doador D6, na presença de L-Name, apresentando conídios dilatados e micélio em proliferação. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.	48

Figura	Página
Figura 22- Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas com conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , na concentração de 1:1 (conídio:célula), por 24 horas, a 37°C. <b>A-</b> Célula fagocítica do doador D5, na ausência de L-Name, apresentando conídios dilatados em seu interior e tubo germinativo; <b>B-</b> Célula fagocítica, do doador D6, na ausência de L-Name, apresentando micélio em proliferação; <b>C-</b> Célula fagocítica do doador D5, na presença de L-Name, apresentando conídios dilatados em seu interior; <b>D-</b> Célula fagocítica do doador D6, na presença de L-Name, apresentando micélio em proliferação. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.	49
Figura 23- Gráfico representativo da região R1 (em vermelho) onde foram analisadas a população de macrófagos e células dendríticas.	51
Figura 24- Média dos percentuais de macrófagos dos doadores D5 e D6 apresentando fluorescência para as moléculas de superfície, CD14, B7.1 e DC-SIGN, na presença e ausência de conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 24 horas de incubação.	52

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 25-	Média dos percentuais de células dendríticas dos doadores D5 e D6 apresentando fluorescência para as moléculas de superfície, CD14, B7.1 e DC-SIGN, na presença e ausência de conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 24 horas de incubação.	53
Figura 26-	Médias dos níveis de secreção de IL1- $\beta$ de macrófagos dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 e 24 horas de incubação.	55
Figura 27-	Médias dos níveis de secreção de IL1- $\beta$ de células dendríticas dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 horas de incubação.	56
Figura 28-	Médias dos níveis de secreção de TNF- $\alpha$ de macrófagos dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 e 24 horas de incubação.	57

Figura	Página
Figura 29- Médias dos níveis de secreção de TNF- $\alpha$ de células dendríticas dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 horas de incubação.	57

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. O fungo <i>Paecilomyces lilacinus</i>	1
1.2. Hialohifomicose causada por <i>Paecilomyces lilacinus</i>	4
1.2.1. Diagnóstico	7
1.2.2. Tratamento	7
1.3. Susceptibilidade <i>in vitro</i> a antifúngicos	8
1.4. Resposta imune inata	10
1.4.1. Macrófagos	12
1.4.2. Células dendríticas	15
1.4.3. Resposta imune na infecção por fungos	17
<u>2 JUSTIFICATIVA</u>	19
<u>3 OBJETIVOS</u>	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
<u>4 METODOLOGIA</u>	21
4.1. Isolado fúngico	21
4.2. Análise morfológica	21
4.3. Obtenção dos conídios	21
4.4. Viabilidade das células fúngicas	22
4.5. Purificação e diferenciação de células mononucleares sanguíneas	22

	<b>Página</b>
4.6. Interação dos conídios de <i>P. lilacinus</i> com macrófagos e células dendríticas (APCs)	24
4.7. Avaliações qualitativa e quantitativa das APCs infectadas pelos conídios de <i>P. lilacinus</i>	25
4.8. Marcação de superfície celular para análise por citometria de fluxo	26
4.9. Detecção de citocinas	26
4.10. Análise estatística	27
4.11. Desenho experimental	27
<b><u>5 RESULTADOS</u></b>	<b>28</b>
5.1. Análise morfológica	28
5.2. Viabilidade dos conídios	30
5.3. Interação da APCs com conídios de <i>P. lilacinus</i>	30
5.3.1. Determinação da proporção de células fúngicas para a interação com as APCs	30
5.3.2. Cinética da interação das APCs com conídios de <i>P. lilacinus</i> em Labteks® em três tempos determinados	36
5.3.3. Interação das APCs com conídios de <i>P. lilacinus</i> em Labteks® com e sem L-Name e em tubos de poliestireno para citometria de fluxo	46
5.3.3.1. APCs x conídios de <i>P. lilacinus</i> em Labteks®	46

5.3.3.2. Percentual de APCs expressando moléculas de superfície (CD14, B7-1 e DC-SIGN) por citometria de fluxo	50
5.3.4. Análise da produção de citocinas, IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ , por macrófagos e células dendríticas interagindo com <i>P. lilacinus</i>	54
<u>6 DISCUSSÃO</u>	58
<u>7 CONCLUSÕES</u>	73
<u>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	75

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O fungo *Paecilomyces lilacinus*

*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson 1974 é um organismo eucarioto, filamentosos, hialino, de reprodução assexuada. Inglis & Tigano (2006) sugeriram que seu teleomorfo, forma sexuada, estaria dentro do gênero *Byssochlamys* e por consequência, classificado como pertencente ao Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales. Entretanto recentes estudos morfológicos e moleculares sugerem que *P. lilacinus* não está relacionado ao gênero *Paecilomyces*. Assim os autores Luangsa-ard *et al.* (2011) propuseram um novo gênero chamado *Purpureocillium* e um novo nome para a espécie foi proposto, *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson 2011. Nesse trabalho, uma vez que ainda a comunidade científica não está familiarizada com a nova terminologia, utilizaremos o nome anterior do fungo, ou seja, *Paecilomyces lilacinus*.

Em relação à morfologia macroscópica, segundo Luangsa-ard *et al.* (2011), esse fungo cresce, rapidamente, em extrato de malte ágar (MEA), atingindo um diâmetro de 25-33 mm, após 7 dias, a 25°C e nenhum ou um

crescimento restrito à temperatura de 35°C (colônias de 0 a 10mm de diâmetro). As colônias se apresentam de aspecto aveludado a flocoso com micélio aéreo, inicialmente branco e após esporulação assumindo a coloração rosada à violeta. O reverso da colônia pode ser incolor ou, na maioria das vezes, se apresenta na cor púrpura.

Ao microscópio (Figura 1) é possível visualizar estruturas de reprodução assexuada como, conidióforos de 4 a 6 µm de comprimento, ocasionalmente formando frouxos sinêmios de até 2 mm de altura. São vistos também pequenas hastes (*stalks*) de parede espessa e rugosa de 3 a 4 µm de extensão consistindo de ramificações verticiladas com 2 a 4 fiálides. Essas fiálides, de 6 a 9 x 2,5 a 3 µm de comprimento, possuem uma porção basal dilatada e um distinto pescoço curto de aproximadamente 1 µm de comprimento. Os conídios, dispostos em cadeias divergentes, são elípticos a fusiformes, de parede lisa ou ligeiramente rugosa, hialino ou quando em massa na cor púrpura medindo de 2 a 3 x 2 a 4 µm. Clamidoporos ausentes (Luangsa-ard *et al.*, 2011).

*P. lilacinus* é um fungo cosmopolita, encontrado, frequentemente como sapróbio em amostras de solo podendo causar deterioração de grãos, alimentos e papel (Blackwell *et al.*, 2000; Garbino *et al.*, 2002). Por ser resistente a maioria das técnicas comerciais de esterilização também pode ser encontrado, como contaminante, de espécimes e materiais clínicos, tais como cateteres e implantes plásticos e de loções e cremes dermatológicos (Castro *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1992; Walsh *et al.*, 2004; Pastor & Guarro, 2006).

Além disso, estudos têm demonstrado o potencial de isolados desse fungo como agente de controle biológico contra nematódeos de plantas (Prabhu *et al.*, 2008). Também foi comprovada a eficácia ovicida de *P. lilacinus*



sobre ovos de *Dipylidium caninum* e *Toxocara canis* (Araújo *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010). Entretanto, é importante enfatizar que *P. lilacinus* é um patógeno oportunista entre hospedeiros comprometidos imunologicamente, cuja incidência de infecções em hospedeiros imunocompetentes está aumentando (Carey *et al.*, 2003). Entre os hospedeiros desse fungo inclui-se o homem, mas também outros animais, como gatos, tartarugas, crocodilos e tatus (Gordon, 1984; Heard *et al.*, 1989; Maslen *et al.*, 1988; Rossler, 2003; Li *et al.*, 2008; Pawloski *et al.*, 2010).

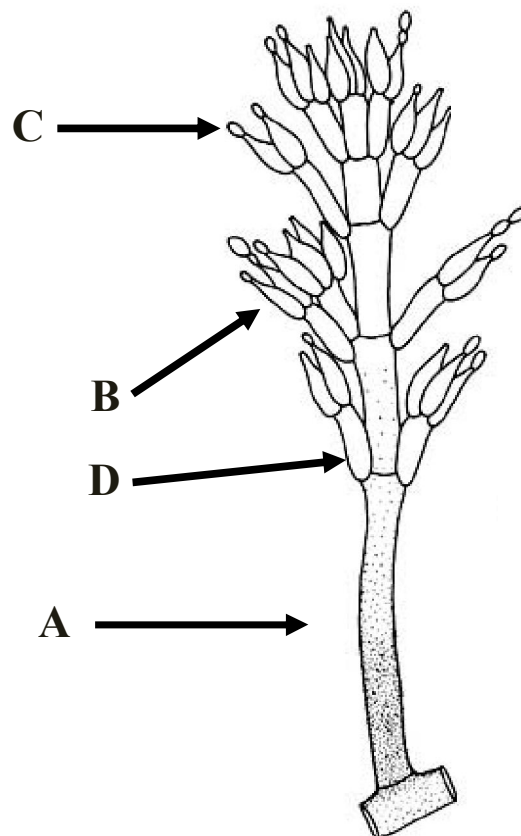


Figura 1 - Esquema representativo da micromorfologia de *Paecilomyces lilacinus* e suas estruturas de reprodução assexuada. A- Conidióforo; B- Fiálides; C- Conídios; D- *Stalks*; (Samson, 1974).

## 1.2. Hialohifomicose causada por *Paecilomyces lilacinus*

Hialohifomicose é um termo que agrupa infecções causadas por diversos fungos filamentosos, que incluem espécies de *Acremonium* spp, *Beauveria* spp, *Fusarium* spp, *Scopulariopsis* spp, e *Paecilomyces* spp. Este grupo de micoses se caracteriza pela presença no tecido do hospedeiro de um micélio hialino (Vartivarian *et al.*, 1993).

O gênero *Paecilomyces* possui duas espécies de grande interesse médico responsáveis pelas infecções em humanos: *P. variotii* e *P. lilacinus*. Este último tem sido responsável pela maior parte dos casos diagnosticados (Williamson *et al.*, 1992; Pintor *et al.*, 2001; Kurzai *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2004; Houbraken *et al.*, 2010). No entanto, outras espécies já foram descritas como agentes causais de hialohifomicoses, como *P. marquandii* e *P. javanicus* (Pastor & Guarro, 2006).

*P. lilacinus* é considerado um importante patógeno oportunista humano, emergente, afetando crianças e adultos (Tan *et al.*, 1992; Perfect & Schell, 1996; Walsh & Groll, 1999; Gunasekera *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2004). Atualmente as infecções atingem tanto indivíduos imunodeprimidos quanto imunocompetentes. A quebra da barreira da pele, a inalação e inoculação por meio de implantes de dispositivos protéticos são as portas de entrada desse

fungo. Infecções nosocomiais têm sido descritas em pacientes imunodeprimidos, induzida pelo uso de loção dermatológica contaminada (Pastor & Guarro, 2006). Os fatores predisponentes para o desenvolvimento da infecção são: tratamento antibacteriano prolongado, transplantes de medula óssea e órgãos, neoplasias, tratamento quimioterápico, imunodeficiência primária ou adquirida, entre outros (Antas *et al.*, 2012).

Em pacientes imunocompetentes *P. lilacinus* causa infecções localizadas e infecções subcutâneas nodulares na pele e em pacientes imunodeprimidos lesões disseminadas (Gutiérrez-Rodero *et al.*, 1999; Gotlieb & Atkins, 2001; Martin *et al.*, 2002; Murciano & Cohen, 1990; Walsh *et al.*, 2004). Carey *et al.* (2003), demonstraram um aumento no número de casos de infecções por *P. lilacinus* em pacientes imunocompetentes, chegando a registrar mais de um caso por ano entre 1996 e 2002.

As manifestações clínicas mais comuns da hialohifomicose causada por *P. lilacinus* são infecções oculares, cutâneas e subcutâneas. Pastor & Guarro (2006) revisaram os casos relatados na literatura e descreveram que as ceratites e endoftalmites foram as manifestações mais comuns, culminando na enucleação do olho afetado e perda da visão. Os fatores de risco foram as lentes intra-oculares, traumas não cirúrgicos com ou sem a presença de um corpo estranho e cirurgias oftálmicas. Os autores ainda relataram que as infecções cutâneas e subcutâneas podem apresentar diferentes quadros clínicos, que vai desde erupções solitárias ou disseminadas na pele a máculas eritematosas, pápulas, vesículas ou nódulos com necrose central. Outros tipos de infecções, como vaginite, abscesso nos pulmões, celulite, sinusite,

osteomielite e infecção disseminada, também têm sido relatadas com menor frequência (Hall *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2004; Pastor & Guarro, 2006).

Mais recentemente, de 2006 a 2008 novos casos de hialohifomicose por *P. lilacinus* foram registrados na literatura, incluindo ceratite, fungemia em neonato, associação com mordida de cão, após transplante renal e de fígado, infecção cutânea associada ao uso de cateter central, bursite do cotovelo, endocardite (Jackson *et al.*, 2006; Malecha *et al.*, 2006; Zendri *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2007; Lott *et al.*, 2007; Schooneveld *et al.*, 2008; Ford *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Wessolossky *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2008). A partir do ano de 2009 novos relatos dessa infecção foram publicados, como os casos de eumicetoma, rinite, infecção de unha em grávida, sinusite maxilar, entre outros (Motswaledi *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2009; Ouinissi *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Rosmaninho *et al.*, 2010; Ciecko *et al.*, 2010; Innocenti *et al.*, 2011; Permi *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Maier *et al.*, 2011).

No Brasil os relatos de infecção causada por *P. lilacinus* são escassos (Castro *et al.*, 1990; Hofling-Lima *et al.*, 2005), não por esse fungo estar ausente da flora micótica do país, mas muito provavelmente, pelo desconhecimento da classe médica-científica em relação ao fungo e a dificuldade de isolamento e identificação. Ele pode ser confundido com outras espécies, como por exemplo, *Penicillium* sp., ou também ser descartado como contaminante do ar.

Um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo analisou a frequência e a etiologia das doenças oculares micóticas diagnosticadas por cultura no Laboratório de Doenças Externas Oculares da

UNIFESP e os fatores associados às ceratites fúngicas. O grupo demonstrou o predomínio de infecções por fungos filamentosos, dentre eles *P. lilacinus*, sobre as leveduras (Hofling-Lima *et al.*, 2005). No Brasil, Pastor & Guarro (2006) em descreveram cinco casos de ceratite causadas por esse fungo.

### 1.2.1. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *P. lilacinus* é baseada, primeiramente, nas características morfológicas do agente isolado em cultura e na histologia das lesões (Liu *et al.*, 1998; Pastor & Guarro, 2006). Entretanto, essa identificação exige dos profissionais relativo conhecimento acerca dos fungos causadores da hialohifomicose, já que as análises se dão basicamente através das características morfológicas fúngicas associada à histopatologia das lesões.

Embora a cultura positiva do fungo seja o padrão ouro para a identificação, o diagnóstico presuntivo baseado nas características histológicas é considerado de grande valor, porque resultados histopatológicos podem ser obtidos mais rápido que o cultivo do fungo (Liu *et al.*, 1998).

Além disso, resultados mais rápidos podem ser obtidos através do diagnóstico molecular, como por exemplo, sequenciamento utilizando *primers* ITS (*internal transcribed spacer*), PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real e *primers* espécie-específico (Atkins *et al.*, 2005; Houbraken *et al.*, 2010).

### 1.2.2. Tratamento

Até o momento, ainda não foi demonstrado um tratamento considerado ideal para as infecções causadas por *P. lilacinus*. Em alguns casos há a necessidade de intervenção cirúrgica associada a antifúngicos (Kurzai *et al.*, 2003; Pastor & Guarro, 2006; Permi *et al.*, 2011).

Fármacos como a anfotericina B, flucitosina, fluconazol, miconazol e itraconazol apresentaram baixa efetividade em casos de hialohifomicose cutânea, sub-cutânea e ocular, em contrapartida, os novos triazólicos, voriconazol e posaconazol, apresentaram maiores índices de cura, porém, seus altos custos inviabilizam o tratamento para muitos pacientes (Deng *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Antas *et al.*, 2012). Huang *et al.* (2011) relataram um caso de infecção cutânea por *P. lilacinus* que respondeu positivamente ao tratamento com voriconazol associado à aplicação tópica de nistatina.

A resistência do *P. lilacinus* a muitos antifúngicos é relatada e tratamentos radicais, em alguns casos, são necessários. Malecha *et al.* (2006) descreveram um caso de ceratite em um paciente de 62 anos de idade no qual foi necessário realizar uma ceratoplastia, injeções de anfotericina B intravitreal, miconazol tópico e fluconazol sistêmico para a erradicação do fungo. Outro caso de ceratite foi relatado por Maier *et al.* (2011), novamente apontando a necessidade de tratamento com antifúngico, no caso voriconazol, associado a ceratoplastia.

Em síntese, muitos casos relatados de hialohifomicose por *P. lilacinus* responderam bem com terapia azólica sistêmica sozinha, ou em associação com drenagem cirúrgica e/ou remoção de próteses (Wessollosky *et al.*, 2008). No geral, o tratamento com agentes antifúngicos orais sem intervenção

cirúrgica tem sido eficiente, somente, para hospedeiros imunocompetentes (Gottlieb & Atkins, 2001).

### **1.3. Susceptibilidade *in vitro* a antifúngicos**

Os estudos sobre a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos para a espécie *P. lilacinus* são limitados. A maioria enfoca o gênero *Paecilomyces*, o que limita a análise dos resultados, pois existem diferenças significativas nas respostas às drogas antifúngicas entre as espécies desse gênero.

Pastor & Guarro (2006) revisaram, de 1978 a 2004, os resultados *in vitro* da atividade de fármacos contra essa espécie e concluíram que a anfotericina B, flucitosina e fluconazol tem baixa atividade, enquanto os antigos derivados azólicos, cetoconazol, miconazol, clotrimazol e itraconazol, tem atividade na concentração inibitória mínima (MIC) de  $> 2$  mg/l a  $\leq 0,01 - 0,5$  mg/l. Já os novos compostos azólicos, posaconazol, voriconazol e ravuconazol, tem mostrado atividades variáveis e em relação as equinocandinas, caspofungina e micafungina apresentaram dados controversos.

Entre esse fármacos testados os novos triazólicos mostraram boa atividade contra *P. lilacinus*, como o voriconazol e o posaconazol com MIC entre  $0,5 - 4$  mg/l e  $0,5 - 2$  mg/l, respectivamente (Gonzalez *et al.*, 2005). Estes testes têm revelado ainda, que a atividade do posaconazol se assemelha com a do voriconazol e que este sozinho ou combinado com outras drogas apresenta boa atividade e eficiência clínica. Por esses motivos e alta resistência de *P. lilacinus* a maioria dos antifúngicos, o voriconazol e o posoconazol representariam uma terapia alternativa eficiente mesmo que já

tenham sido relatados casos de resistência ao voriconazol tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Antas *et al.*, 2012).

Recentemente foi descrito um novo antifúngico denominado E1210 com potente atividade contra isolados clínicos de leveduras e fungos filamentosos, incluindo *P. lilacinus*. Esse fármaco está sendo apontado como promissor para o tratamento de infecções fúngicas invasivas (Miyazaki *et al.*, 2011) quando comparada aos medicamentos fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e micafungina.

#### **1.4. Resposta imune inata**

O sistema imune inato é uma forma ancestral e universal de discriminação de perfis moleculares composto por vários tipos celulares com morfologia variada e atuação específica durante a resposta imune frente aos mais variados antígenos. Dentre as células que fazem parte deste sistema, podemos citar os macrófagos, as células dendríticas, células NK (*Natural Killers*) e os neutrófilos (Peakman & Vergani, 1999). O reconhecimento imune inato depende de um número limitado de receptores. Esses receptores de padrões de reconhecimento (PRRs) estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) (Janeway *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2008).

Dentre os PRRs, os receptores *Toll-like receptors* (TLR), uma proteína descoberta em *Drosophilas* (Lemaitre *et al.*, 1996), vêm se destacando pelo seu papel central na ligação de patógenos e iniciação da resposta inflamatória. Tais receptores estão localizados em várias células do organismo dos



mamíferos, mas principalmente nas células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas. A ativação desses receptores por PAMPs induz a fagocitose e a liberação de citocinas e mediadores químicos que atuam no sistema imune.

Os leucócitos são células que circulam pelos sistemas linfático e sanguíneo cuja função é mediar a resposta imune do hospedeiro frente a uma injúria tecidual e/ou infecção. São divididos em diferentes grupos de acordo com suas funções e características, porém, todas possuem origem nas células tronco hematopoiéticas e se diferenciam de acordo com estímulo específico ao amadurecimento. Um subgrupo de leucócitos derivados de células mielóides da medula óssea (chamadas de células do sistema mononuclear fagocítico) após deixar o local de origem e penetrar no sangue periférico são conhecidas como monócitos, que após diferenciação se transformam em macrófagos ou células dendríticas.

As células apresentadoras de antígenos fazem parte do sistema imune inato do hospedeiro e incluem os macrófagos, células dendríticas e linfócitos B cujas funções são fagocitar o organismo invasor, prepará-lo e apresentá-lo para as células T, iniciando assim a resposta imune adaptativa. Os macrófagos e as células dendríticas se desenvolvem a partir de precursores da medula óssea e migram para tecidos e órgãos onde permanecem desativados aguardando maturação e ativação.

Uma vez estabelecido o reconhecimento entre APCs e linfócitos T, os mecanismos de controle de proliferação parasitária intracelular são disparados e as células fagocíticas produzem um grande número de componentes microbicidas, como radicais livres, peptídeos antimicrobianos, e óxido nítrico

(NO) (Viaro & Évora, 2000). O óxido nítrico, um gás mediador químico da inflamação, é considerado como um potente vasodilatador, com importantes atividades microbicidas e antiparasitárias através de seus reativos intermediários, atribuindo-lhe a característica de defesa contra patógenos (Viaro & Évora, 2000; Souza, 2010). Camundongos deficientes na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) são incapazes de controlar a infecção por *Leishmania* e seus macrófagos não conseguem eliminar as formas promastigotas da cultura (Olivier, 2005).

#### **1.4.1. Macrófagos**

Os fagócitos são importantes em todo o reino animal e são altamente desenvolvidos nos vertebrados. Um litro de sangue humano contém cerca de seis mil milhões de fagócitos. O seu nome vem do grego *phagein*, "comer ou devorar", e *kutos*, "vaso oco". Os fagócitos foram primeiramente descobertos em 1882 por Ilya Mechnikov (Nobel Lectures, 1967). Foi atribuído à Mechnikov o Nobel de Fisiologia/Medicina de 1908 pela sua descoberta. Os fagócitos ocorrem em muitas espécies; algumas amebas comportam-se como macrófagos, o que sugere que os fagócitos apareceram cedo na evolução da vida. Os fagócitos dos seres humanos e outros animais são chamados profissionais ou não profissionais, dependendo da forma como são eficazes na fagocitose. Os fagócitos profissionais incluem células denominadas de neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos. A principal diferença entre os fagócitos profissionais e não profissionais é que os profissionais possuem moléculas chamadas receptores na sua superfície que

podem detectar elementos prejudiciais, tais como bactérias, que normalmente não são encontrados no corpo. Os fagócitos são, portanto, fundamentais na luta contra infecções, bem como em manter os tecidos saudáveis através da remoção de tecidos mortos e células que chegaram ao fim do seu ciclo de vida.

Os macrófagos originam-se de células precursoras da medula óssea que se desenvolvem em monócitos e estes, nos tecidos, amadurecem dando origem aos macrófagos (MØ) (Figura 2). São células fagocíticas residentes dos tecidos linfóides e não linfóides, acredita-se estarem envolvidas no controle da homeostase nos tecidos (Geissmann *et al.*, 2010).

Os macrófagos podem assumir diferentes formas morfológicas após ativação dependendo do tipo de estímulo externo. Alguns desenvolvem citoplasma abundante e são chamados de células epitelióides, em virtude de sua semelhança com células epiteliais da pele. Os macrófagos ativados podem se fundir para formar células gigantes multinucleadas. Recebem nomes especiais dependendo de sua localização e funções (histiócitos - macrófagos do tecido conjuntivo; células de Kupffer – macrófagos do fígado; macrófagos alveolares - localizados nos pulmões; macrófagos pleurais e peritoneais- localizados nos linfonodos, baço, medula óssea e fluidos serosos; células de Langerhans- macrófagos da pele) respondendo tipicamente aos microrganismos quase tão rapidamente quanto os neutrófilos, mas persistem por muito mais tempo nos locais da inflamação (Halliwell & Gutteridge, 1999; Abbas *et al.*, 2008).

Uma grande variedade de citocinas são secretadas pelos macrófagos como as interleucinas IL-1, IL6 e IL-8 e o fator de necrose tumoral (TNF) modulando a resposta imune inata e sinalizando linfócitos T via IL-10, IL-12 e

IL-18 a iniciar respostas específicas contra patógenos intra ou extracelulares. Podem ainda exercer a função de defesa de maneira direta com a liberação de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-1, eicosanóides, espécies ativas de oxigênio (ROS) e espécies ativas de nitrogênio (RNS). Um exemplo de RNS é a molécula de óxido nítrico (ON) cujas funções incluem relaxamento do músculo liso; inibição de agregação e adesão de plaquetas; morte de patógenos por sua citotoxicidade (Vieira, 2008).

Dentre as funções dos macrófagos podemos citar: a fagocitose; o processamento e apresentações de antígenos aos linfócitos T; secreção de fatores de crescimento protéicos que estimulam o crescimento e a divisão de linfócitos T para formar uma grande população de linfócitos T sensibilizados (Tortora, 2000). Os macrófagos ativados são maiores que os inativos, possuindo diversas características que lhes conferem maior eficiência na destruição de patógenos e células tumorais como por exemplos maior aderência, distribuição, capacidade de endocitose e produção de grandes quantidades de ROS e RNS (Vieira, 2008).

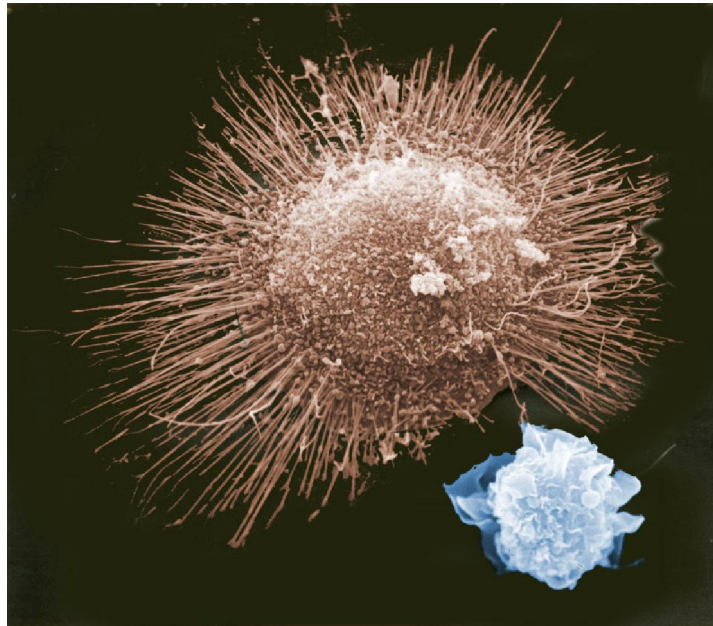


Figura 2- Fotomicrografia eletrônica de macrófago aderente derivado de sangue periférico. Fonte: [www.uni-ulm.de/expane](http://www.uni-ulm.de/expane) (Acesso em 16/12/2011).

#### 1.4.2. Células dendríticas

Estas células surgem como exemplo característico dessa ponte entre imunidade inata e adaptativa. Originam-se de precursores linfóides ou mielóides na medula óssea e dois tipos de receptores de membrana podem ser classificados como típicos da atividade dupla dessas células: os receptores que captam antígenos e ativam a célula (e os TLRs fazem parte de tais receptores) e os produtos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que apresentam os antígenos captados e processados para linfócitos T (Steinman, 1991; Sallusto *et al.*, 1995; Janeway *et al.*, 2000; Hong & Jeong, 2005).

Células dendríticas (DCs) (Figura 3) são caracterizadas por dois papéis essenciais: (i) ampliação das respostas imunes inatas e (ii) ativação das respostas imunes adaptativas (Santos *et al.*, 2007). Os PRRs expressos pelas

DCs incluem os TLRs (cuja função é se ligar a um produto microbiano específico, resultando na transcrição de múltiplos genes pró-inflamatórios), C-type lectina e o CD1a, os quais reconhecem características moleculares específicas expressas em patógenos (Santos *et al.*, 2007).

Durante a última década, após a associação dos receptores tipo *Toll* (TLRs) e a expressão de antígenos MHC classe II pelas DCs e a produção de citocina, ficou claro que as DCs podem desempenhar papéis chaves durante a iniciação da resposta imune inata. As DCs compõem um grupo heterogêneo de APCs que podem ser divididas em diversos subtipos, de acordo com o fenótipo de sua superfície e função (Heath *et al.*, 2004; Shortman & Liu, 2002, *apud* Wilkins-Rodríguez *et al.*, 2010).

Células dendríticas são importantes sentinelas do sistema imune, e estudos de interações de DCs com células T identificaram um novo receptor sobre DC chamado DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Este receptor dispara o contato inicial entre DC e célula T através da ligação ao ICAM-3 sobre a célula T. A identificação deste receptor sobre DC tem sido bastante útil na compreensão do mecanismo pelos quais vários antígenos causam infecção (Santos *et al.*, 2007). DC-SIGN tem sido considerado como marcador de diferenciação de DC derivada de monócito, uma molécula, especificamente, expressa sobre monócitos tratados por IL-4 e, cuja expressão está sujeita a regulação por várias citocinas e fatores de crescimento (Geijtenbeek *et al.*, 2000).

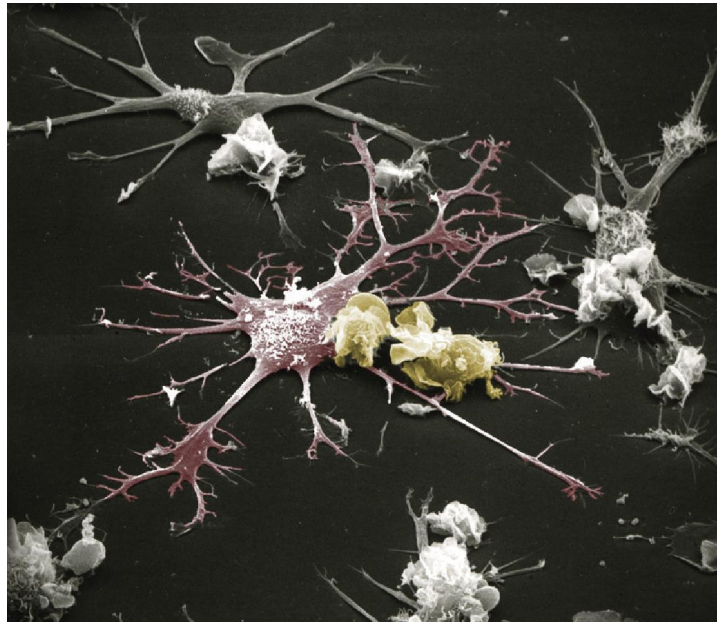


Figura 3- Fotomicrografia eletrônica de células dendríticas derivadas de medula óssea. Fonte: [www.uni-ulm.de/expane](http://www.uni-ulm.de/expane) (Acesso em 16/12/2011).

#### **1.4.3. Resposta imune na infecção por fungos**

A resposta imune contra fungos causadores de micoses teciduais é desenvolvida principalmente pelos fagócitos, que os eliminam através da fagocitose/secreção de alguns componentes, como óxido nítrico (NO) e radicais derivados de oxigênio. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) também participa aumentando a atividade de neutrófilos e macrófagos, não sendo detectada a ação citotóxica de linfócitos CD8<sup>+</sup>. Sugere-se que os polimorfonucleares inibam o crescimento das hifas, enquanto que os macrófagos impedem a germinação dos conídios e o crescimento das hifas (Monzón & Tudela, 2001 *apud* Vieira, 2008; Brakhage *et al.*, 2010).

Frequentemente, as micoses não superficiais desenvolvem-se em hospedeiros com resposta imune celular suprimida ou deficiente (Machado *et al.*, 2004). Estudos envolvendo o desenvolvimento de micoses oportunistas em pacientes HIV+ têm demonstrado que células T CD4<sup>+</sup> apresentam importante papel protetor, inviabilizando o estabelecimento e a manutenção destas infecções (Hohl *et al.*, 2006).

A resposta imune contra fungos oportunistas, como *Penicillium marneffeii* e *Aspergillus fumigatus*, tem sido avaliada em diversos estudos tanto em pacientes como em modelos experimentais (Kudeken *et al.*, 1996; Centeno-Lima *et al.*, 2002; Hebart *et al.*, 2002; Roilides *et al.*, 2003; Sisto *et al.*, 2003). Em animais com depleção de células T, a infecção por *Pe. manerffei* é fatal, porém em um hospedeiro saudável, dependendo do tamanho do inóculo, o fungo é eliminado rapidamente pela resposta imune mediada principalmente por células T e macrófagos com produção de IFN- $\gamma$  (Sisto *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram que as células T-helper 1 (Th 1) contribuem para a defesa do hospedeiro contra *A. fumigatus*. A estimulação de células Th1, como IFN- $\gamma$ , aumenta a atividade fungicida, enquanto que o oposto ocorre quando as células são estimuladas com citocinas com perfil Th2, como IL-4 e IL-10 (Djeu, 1993; Roilides *et al.*, 1993; 1997).

Relatos de Brieland *et al.* (2001) usando um modelo murino de aspergilose pulmonar primária, em camundongos imunocompetentes, descreveram que citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-8, IL-12 e TNF-  $\alpha$  endógenos, exercem um papel fundamental na defesa desta infecção, devido a seus efeitos modulatórios na eliminação do fungo e na atividade fagocítica.



A associação entre deficiência imune e consequência patológica sugere a importância dos componentes do sistema imune no controle da infecção. Neste contexto, em 1992, foram relatados dois casos de infecção por espécies de *Paecilomyces* em crianças portadoras de doença granulomatosa crônica (CDG) (Silliman *et al.*, 1992; Williamson *et al.*, 1992). Em um dos casos descritos acima, causado por *P. lilacinus* resultou em abscessos na parede abdominal e após terapia antifúngica houve cura, porém uma infecção por *A. fumigatus* resultou em óbito. A CDG é um distúrbio hereditário resultante da incapacidade dos fagócitos de eliminar certos tipos de bactérias e fungos, levando a infecções potencialmente fatais como foi o caso da infecção por *A. fumigatus* (Tauber *et al.*, 1983). Outros casos humanos de infecção pelo *P. lilacinus* descrito na literatura reforçam a existência de uma relação direta entre deficiência imunológica (transplante, HIV+, entre outros) e doença (Gucalp *et al.*, 1996; Orth *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA

*Paecilomyces lilacinus* é um agente oportunista emergente, resistente a técnicas convencionais de esterilização e a diversas drogas antifúngicas. Muitos casos de infecção por este agente ocorrem em pacientes com problemas em suas defesas naturais ou após procedimentos cirúrgicos, cujo tratamento necessita, muitas vezes, associar prescrição de antifúngicos à intervenção cirúrgica. Entretanto, o número de casos de infecções por esse fungo, em pacientes imunocompetentes, vem aumentando ao longo dos anos.

Recentemente um único estudo de interação, *in vitro*, de macrófagos com conídios de *P. lilacinus*, mostrou que as células fúngicas foram fagocitadas

por macrófagos de camundongos imunocompetentes nos primeiros 30 minutos de interação, e ao longo do experimento produziram tubos germinativos e formaram micélio que culminou com a destruição dos macrófagos (Peixoto *et al.*, 2010). Os resultados demonstraram que os conídios foram capazes de infectar os fagócitos e permaneceram metabolicamente ativos ao longo do período de observação. Entretanto, *P. lilacinus* é descrito como um fungo de baixa virulência necessitando de grande quantidade de células para estabelecer uma infecção experimental em mamíferos imunodeprimidos (Pastor & Guarro, 2006).

Diante dos poucos dados disponíveis, na literatura científica, sobre a capacidade invasiva desse fungo e a inexistência de informações sobre a interação de *P. lilacinus* com células apresentadoras de antígenos humanas, o estudo que ora propomos, se justifica por contribuir para melhor compreensão da patogênese da hialohifomicose, com possibilidade de avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento desta enfermidade.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar a interação de células apresentadoras de antígenos (APCs), macrófagos e células dendríticas, ambos derivados de monócitos isolados de sangue periférico humano, com *Paecilomyces lilacinus*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 1- Autenticar o isolado de *P. lilacinus* por suas características morfológicas;
- 2- Analisar qualitativa e quantitativamente, por microscopia óptica, a interação de conídios do fungo *P. lilacinus* com as APCs;
- 3- Analisar de forma indireta, a influência do óxido nítrico na interação de conídios com as APCs, na presença L-Name;
- 4- Verificar a expressão dos marcadores CD14, DC-SIGN e B7.1 e a produção de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) na interação de conídios do fungo *P. lilacinus* com as APCs;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1. Isolado fúngico

O isolado utilizado foi proveniente de um caso clínico humano de hialohifomicose de seio nasal por *Paecilomyces lilacinus* (PI.S), gentilmente cedido pela Dra. Annette W. Fothergill do *Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center em San Antonio*. As culturas foram mantidas em meio batata dextrose ágar (BDA, Dfico) no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos – Fiocruz.

## **4.2. Análise morfológica**

A análise das características morfológicas do isolado foi realizada através da observação macroscópica do crescimento das colônias em placas de Petri, em meio BDA, após 14 dias de crescimento. Foi realizado, também, o microcultivo em meio extrato de malte ágar (MEA), segundo Riddell (1950), objetivando uma análise minuciosa da micromorfologia. As lâminas, depois de coradas com Lactonefol de Amann acrescido de azul de algodão, foram observadas em microscópio óptico Zeiss modelo Axiophot.

## **4.3. Obtenção dos conídios**

O isolado fúngico foi cultivado em tubo contendo meio BDA, à temperatura ambiente, e após 14 dias de crescimento foram adicionados 5 ml de salina tamponada com fosfato (PBS 50 mM, Sigma), seguido de raspagem da superfície da colônia. A fase líquida, contendo os conídios e hifas em suspensão, foi incubada por 5 min em gelo, homogeneizada em vórtex por 3 min e incubada em estufa (37°C) por 5 min. Após esse período de incubação, a suspensão foi centrifugada por 30 min a 40 x g e o sobrenadante coletado. Os conídios, presentes no sobrenadante, foram quantificados em câmara de Neubauer, acondicionados à temperatura de 4°C, para serem, imediatamente, utilizados nos procedimentos de interação.

#### 4.4. Viabilidade das células fúngicas

Para a análise da viabilidade, logo após o procedimento de obtenção dos conídios, 200 µl desse material foi cultivado, em duplicata, em placas de Petri contendo meio BDA para a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC), segundo Gohman-Yahr *et al* (1980).

#### 4.5. Purificação e diferenciação de células mononucleares sanguíneas

O trabalho utilizou capa leucoplaquetaria (*buffy coat*), subproduto da separação em componentes de sangue total colhido de oito doadores normais voluntários, cedidos pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ). Foi inscrito no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUCFF- Universidade Federal do Rio de Janeiro e aprovado pela licença no. 168/09.

As *buffy coats* humanas ( $\cong$  20 ml) foram purificadas para a obtenção dos monócitos. O procedimento seguiu o protocolo de purificação e diferenciação celular usado na rotina do Labiopac de acordo com Santos *et al.* (2001). O sangue foi transferido para tubos Falcon e suplementado em mesma proporção com o meio [RPMI (Gibco) + 200 U/ml de penicilina e 200 µg/ml de streptomina + 10% de soro fetal bovino (Hyclone)] e adicionado lentamente na proporção de 1/3 do gradiente de Ficoll-Hypaque densidade 1,077 mg/ml (Sigma). O material foi levado à centrífuga por 30 min, a 670 x g, em temperatura ambiente. Foi feita a coleta do anel contendo as células mononucleares e estas removidas para outro tubo Falcon, sendo feita uma nova lavagem com PBS (pH 7,2) e o material ressuspenso em meio RPMI

como descrito acima. Neste momento, foi realizada uma nova centrifugação por 12 min, a 240 x g, a 4°C para a remoção do contaminante plaquetário. O sobrenadante foi descartado e efetuada uma nova ressuspensão em meio RPMI e, centrifugado a 380 x g, durante 10 min, a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e ao tubo Falcon contendo as células mononucleares, foi acrescentado meio RPMI completo para a homogeneização. Retirada uma alíquota de 10 µl de células, foi então adicionado 90 µl de corante azul de trypan diluído a 0,04% (Gibco) para a contagem das células em câmara de Neubauer.

Após quantificação as células foram submetidas a agregação a 4°C (*cold-aggregation*), por 30 min, com o objetivo de purificar os monócitos a partir do anel de células mononucleares. De acordo com Santos *et al.* (2001), por este método, ocorre o enriquecimento de monócitos em solução. Logo em seguida, os agregados de monócitos sedimentaram após rápida centrifugação por 40 seg, a 380 x g, a 4°C. Os monócitos purificados foram quantificados em câmara de Neubauer e plaqueadas numa concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço, em meio RPMI completo em Labteks® de 8 poços (para ensaios de análise morfológica e ELISA) ou na proporção de  $10^6$  células em tubos de poliestireno (para ensaios de citometria de fluxo), e em ambos os casos, foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para que ocorresse a diferenciação destes monócitos em macrófagos (MØ) e células dendríticas (DC), parte destas células foi incubada com as citocinas rhGM-CSF (100 IU/mL, Peprotech) e rhIL-4 (1000 IU/mL, Peprotech) para obtenção de células dendríticas. A outra parte de monócitos permaneceu na ausência destas citocinas para diferenciação em macrófagos. O processo

de diferenciação de monócitos em ambas as células (DC e MØ) se fez no período de 10 dias.

#### **4.6. Interação dos conídios de *P. lilacinus* com macrófagos e células dendríticas (APCs)**

Os conídios de *P. lilacinus*, recém isolados foram incubados com macrófagos ou células dendríticas em Labteks® de 8 poços ou em tubos de poliestireno (cultivados conforme descrito no item 4.5), em diferentes concentrações de conídios:célula (1:1; 2:1; 3:1; 5:1), dependendo do experimento, e mantidos a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em tempos determinados de incubação por experimento (1h, 3h, 6h, 24h), os sobrenadantes foram coletados e estocados à -20°C para posterior dosagem de citocinas por Elisa. As células nas Labteks foram lavadas com PBS (Gibco), à temperatura ambiente, fixadas com metanol por 3 min e coradas com Giemsa (Sigma) durante 8 min, de acordo com Vieira (2008), e posteriormente, analisadas em microscópio óptico Zeiss modelo Axiophot.

Em alguns ensaios, as APCs em Labteks® foram pré-tratadas com 20 µM (Sigma) de inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), L-Name (N-nitro-L-arginina-metil-éster), por 3h, antes do processo de interação com o fungo. As mesmas foram cultivadas em: (1) em Labteks®, para ensaios morfológicos e quantitativos e, (2) em tubos de poliestireno para ensaios de citometria de fluxo. As APCs foram pré-tratadas ou não com 0,5 µg/ml de PMA (*Phorbol myristate acetate*-Sigma), por 1 hora, como condição controle-positivo para marcação de moléculas de superfície e produção de citocinas.

#### **4.7. Avaliação qualitativa e quantitativa das APCs infectadas pelos conídios de *P. lilacinus***

Para a avaliação qualitativa da interação dos conídios com as APCs, foram analisadas, por microscopia óptica, as alterações morfológicas em todas as células envolvidas na interação.

Para a avaliação quantitativa da interação dos conídios com as APCs no tempo de 6h de incubação, o percentual de células humanas infectadas pelos conídios foi determinado por microscopia óptica, a partir da contagem do número de células em 100 campos, em duplicata, e aplicando-se a fórmula:  $[(APC \text{ com fungo} - APC \text{ sem fungo}) \div APC \text{ sem fungo}] \times 100$ , segundo Pinheiro *et al.* (2012).

#### **4.8. Marcação de superfície celular para análise por citometria de fluxo**

O procedimento seguiu o protocolo de Santos *et al.* (2007). As células foram lavadas com 200  $\mu$ l de tampão (PBS + 0,1% de BSA + 0,01% de azida sódica) através de centrifugação por 5 min, a 380 x g, a 4°C e, depois, incubadas com 10  $\mu$ g/ml anti-CD-14-FITC (Becton & Dickinson) para marcar monócitos; 10  $\mu$ g/ml anti-CD209 (DC-SIGN)-PerCP-Cy (Becton & Dickinson) para marcar DC-SIGN e 10  $\mu$ g/ml (Sigma) de anti-B7.1-FITC para marcar a molécula co-estimulatória B7.1 durante 1 hora, no gelo, ao abrigo da luz. Após este tempo, as APCs foram lavadas duas vezes com PBS-Dulbecco (Sigma), por meio de centrifugação por 5 min, a 380 x g, a 4°C para retirada do meio de



cultura. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e ao *pellet* adicionado 200  $\mu$ l de tampão (PBS + 0,1% de BSA + 0,01% de azida sódica). Os tubos foram homogeneizados, em vórtex, e posteriormente centrifugados duas vezes por 5 min, a 380 x g, a 4°C. As células foram fixadas com 200  $\mu$ l de paraformaldeído (Sigma) a 1%, homogeneizadas em vórtex e a expressão dos marcadores de superfície celular analisada em citômetro de fluxo (Accuri C6, Ann Arbor, MI, EUA).

#### **4.9. Detecção de citocinas**

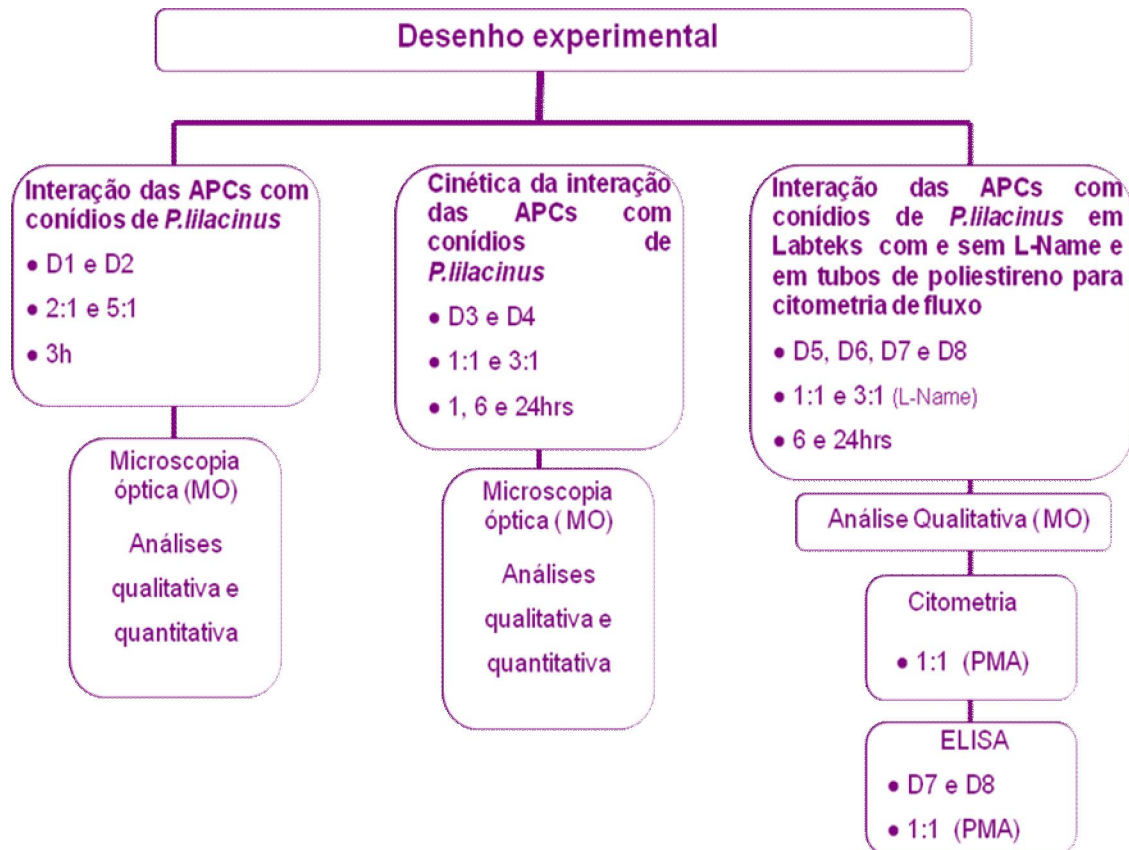
A produção de citocinas, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , foi verificada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), a partir da coleta de sobrenadantes provenientes da interação dos conídios com as APCs em Labteks®. O experimento foi realizado segundo as especificações do fabricante dos kits (Invitrogen). Os resultados foram obtidos através de leitor de ELISA à 570 nm.

#### **4.10. Análise estatística**

Comparação entre os percentuais de infecção das APCs, provenientes de diferentes doadores, infectadas pelos conídios de *P. lilacinus* foi realizada pelo teste t-student.

#### **4.11. Desenho experimental**

Esquema representativo dos experimentos realizados e suas respectivas análises.



## 5 RESULTADOS

### 5.1. Análise morfológica

Na avaliação macroscópica, a colônia de *Paecilomyces lilacinus*, isolado PI.S, apresentou-se de forma aveludada a flocosa com micélio aéreo, inicialmente na cor branca e após a esporulação assumindo a cor rosada à violeta, como descrito por Luangsa-ard *et al.* (2011) (Figura 4).

Durante a análise microscópica do microcultivo do isolado foi possível observar as respectivas estruturas características da espécie *P. lilacinus* como, hifas hialinas septadas e ramificadas, além de estruturas reprodutivas como

conidióforos, fiálides lembrando a forma de uma garrafa, com base arredondada e terminando em pescoço fino e conídios elípticos a fusiformes, muitas vezes formando longas cadeias (Figuras 5 e 6).

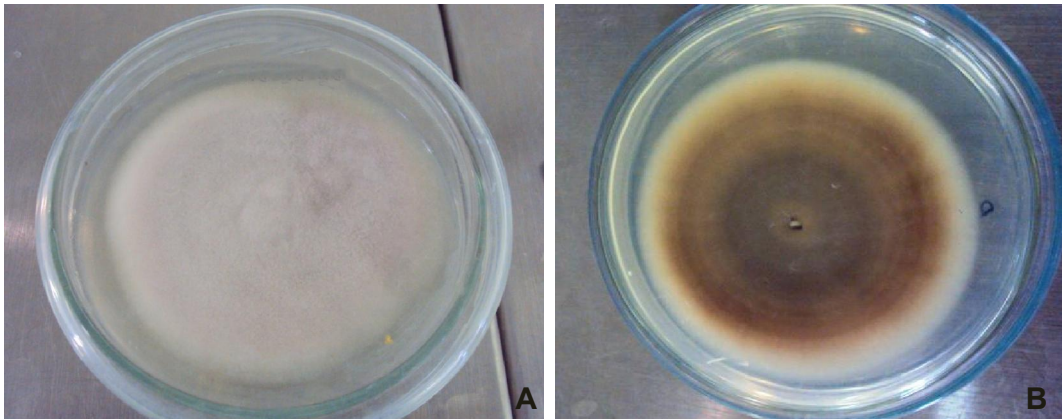


Figura 4- Macrocultura de *Paecilomyces lilacinus* (Pl.S), em meio BDA, à temperatura ambiente, aos 14 dias de crescimento, apresentando (A) colônia aveludada na cor rosa e (B) reverso púrpura.

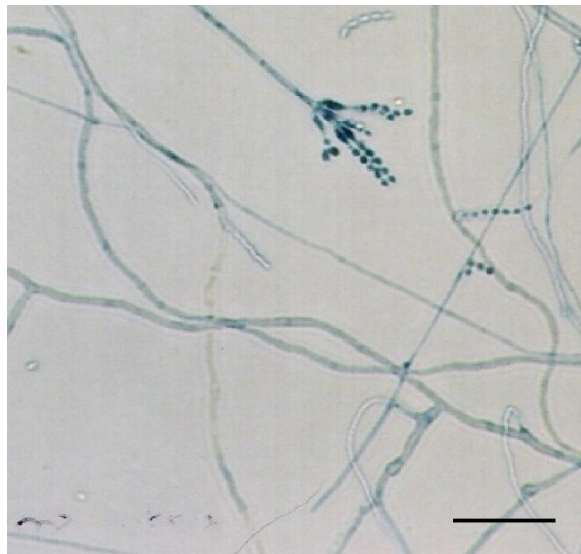


Figura 5 – Microcultura de *Paecilomyces lilacinus* (Pl.S), em meio MEA, à temperatura ambiente, aos 14 dias de crescimento. Aumento original 400x; — = 10  $\mu$ m.

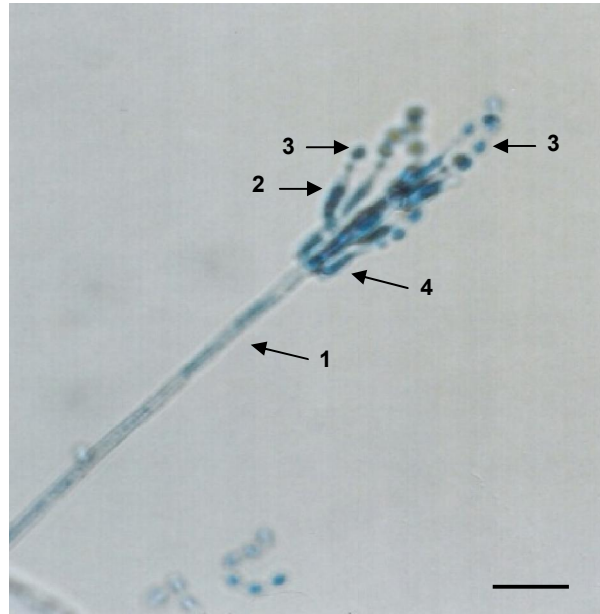


Figura 6 – Microcultura de *Paecilomyces lilacinus* (Pl.S), em meio MEA, à temperatura ambiente, aos 14 dias de crescimento. 1- Conidióforo; 2- Fiálide com base arredondada e pescoço fino; 3- Conídios; 4- *Stalk*. Aumento original 1000x; — = 10  $\mu$ m.

## 5.2. Viabilidade dos conídios

Os conídios do isolado em estudo (Pl.S) apresentaram no teste de células viáveis uma média de 86% de viabilidade nos experimentos realizados.

## 5.3. Interação das APCs com conídios de *P. lilacinus*

### 5.3.1. Determinação da proporção de células fúngicas para a interação com as APCs

Para a padronização da concentração de conídios, a ser utilizada durante a interação com as APCs (macrófagos e células dendríticas) de dois doadores (D1 e D2), um experimento piloto foi realizado. Duas concentrações de conídios em relação ao número de macrófagos e células dendríticas foram testadas, 2:1 e 5:1 (conídio:APC), no tempo de 3 horas de interação, à temperatura de 37°C.

A análise qualitativa revelou que os macrófagos do grupo controle apresentaram citoplasma expandido, com projeções em sua membrana e núcleo volumoso (Figura 7), características típicas dessas células quando *in vitro* (Vieira, 2008). As células dendríticas, também do mesmo grupo acima (Figura 8), apresentaram forma alongada, com projeções citoplasmáticas formando pequenos dendritos características típicas dessas células quando *in vitro* (Coelho, 2009).

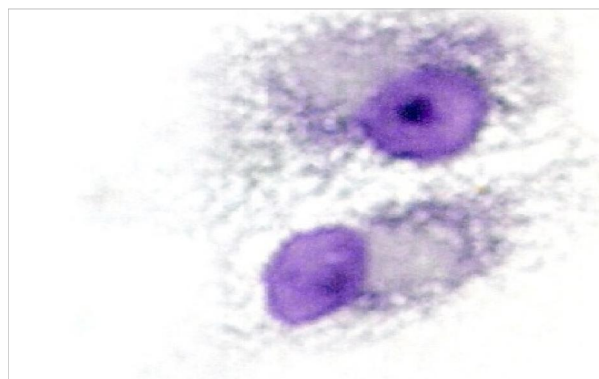


Figura 7. Fotomicrografia óptica (doador D2/ grupo controle) de macrófagos derivados de monócitos isolados de sangue periférico humano aos 10 dias de cultura. Coloração Giemsa. Células apresentando citoplasma expandido, com projeções em sua membrana e núcleo volumoso. Aumento original 1000x; — = 10  $\mu$ m.

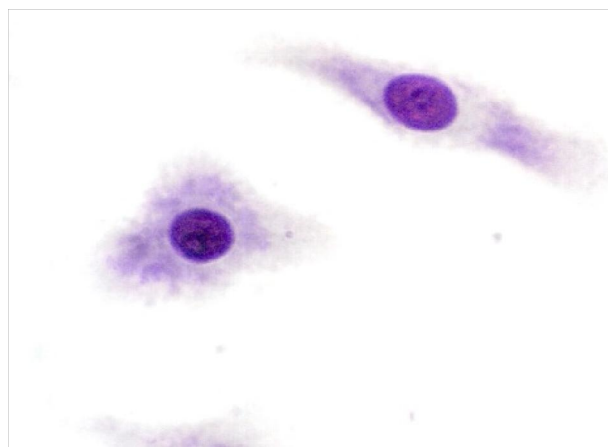


Figura 8. Fotomicrografia óptica (doador D2, grupo controle) de células dendríticas derivadas de monócitos isolados de sangue periférico humano e incubados com as citocinas rhGM-CSF e rhIL-4 aos 10 dias de cultura. Coloração Giemsa. Células apresentando forma alongada, com projeções citoplasmáticas formando pequenos dendritos. Aumento original 1000x; — = 10  $\mu$ m.

Tanto os macrófagos quanto as células dendríticas, em ambas as concentrações dos conídios de *P. lilacinus* (2:1 e 5:1), fagocitaram as células fúngicas. O processo de internalização dos conídios foi visualizado pela presença dos mesmos em vacúolos celulares (Figuras 9 e 10). Não foram observadas, na avaliação qualitativa, diferenças entre os doadores estudados.

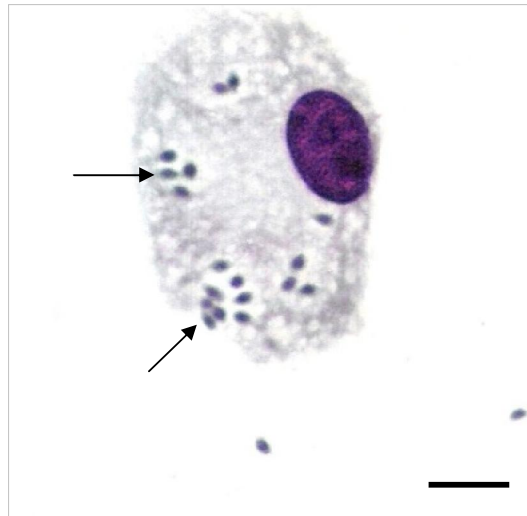


Figura 9 – Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos, doador D2, com conídios de *P. lilacinus*, concentração 2:1, por 3 horas, a 37°C. Presença de conídios fúngicos no interior de vacúolos ( → ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.



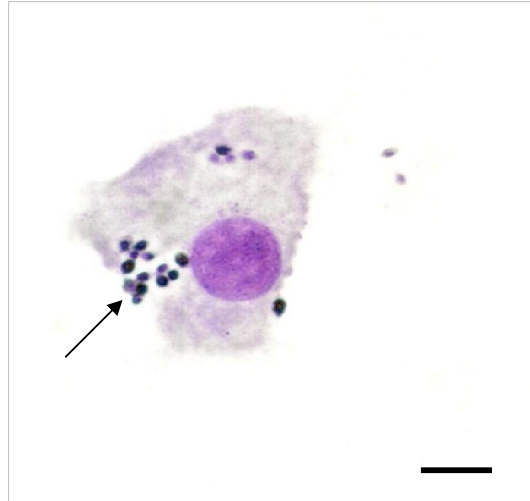


Figura 10 – Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas, doador D2, com conídios de *P. lilacinus*, concentração 2:1, por 3 horas, a 37°C. Presença de conídios fúngicos no interior de vacúolos ( → ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.

Em relação à quantificação das células infectadas foi observado que o doador D1 apresentou 72,6% de macrófagos e 40,7% de células dendríticas infectados. Por outro lado, o doador D2 apresentou um número maior de

células infectadas, sendo 81% para os macrófagos e 68% para as células dendríticas (Figura 11). Não houve diferenças significativas entre o percentual fagocítico dos macrófagos e células dendríticas de cada doador (D1:  $P= 1,87$  e D2:  $P= 7,06$ ), como também entre os doadores (MØ:  $P=3,78$  e DC:  $P= 8,74$ ).

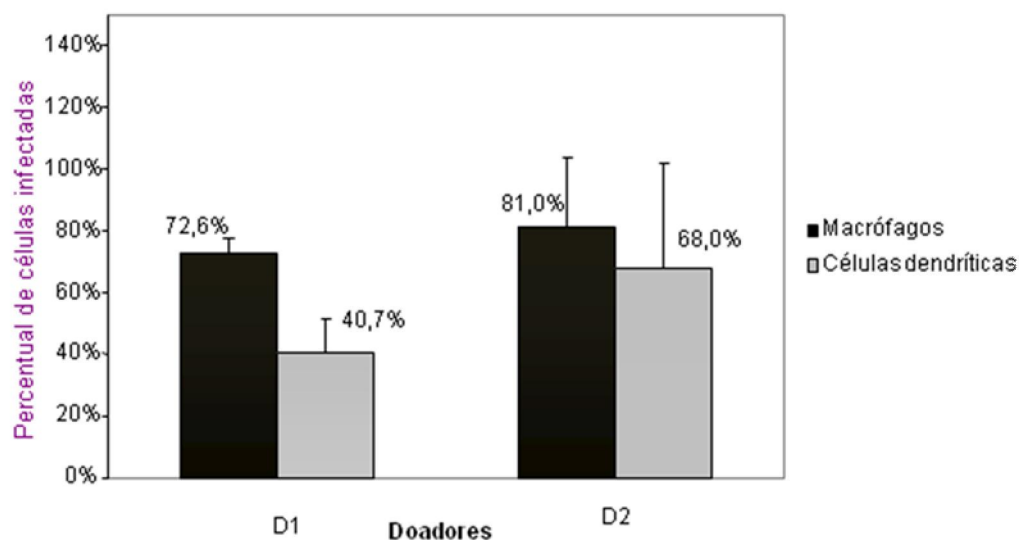


Figura 11 - Percentual de macrófagos e células dendríticas infectadas de dois doadores D1 e D2, durante interação com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 2:1, por 3 horas, a 37°C.

No processo de interação das APCs com os conídios do fungo, na concentração de 5:1 (conídio:célula), as células humanas fagocitaram os

conídios de modo semelhante ao observado para a concentração de 2:1. Porém, devido a um grande número de conídios no interior e no exterior das células a avaliação, principalmente, quantitativa do experimento foi dificultada (dados não mostrados).

### **5.3.2. Cinética da interação das APCs com conídios de *P. lilacinus* em Labteks® em três tempos determinados**

Macrófagos e células dendríticas dos doadores D3 e D4 interagiram com conídios do fungo nas concentrações 1:1 e 3:1 (conídio:célula), nos tempos de incubação de 1, 6 e 24 horas. Novas concentrações foram utilizadas, uma vez que no experimento piloto os resultados demonstraram que concentrações menores de conídios em relação às células fagocíticas poderiam ser usadas para que o processo de internalização e as etapas posteriores da interação fossem visualizadas mais detalhadamente.

A avaliação da interação das células com os conídios, em ambas as concentrações, no tempo de 1 hora, revelou que nesse período, tanto os macrófagos quanto as células dendríticas apresentaram conídios fagocitados delimitados por vacúolos caracterizando a via endocítica de internalização de *P. lilacinus*, como observado no experimento piloto (Figura 12A e 12B). Também foram visualizados conídios não delimitados por membrana, sugerindo que os mesmos poderiam estar apenas aderidos à superfície das APCs (dados não mostrados). Não houve diferenças, durante a análise qualitativa da interação, entre as células dos doadores (D3 e D4) avaliadas.

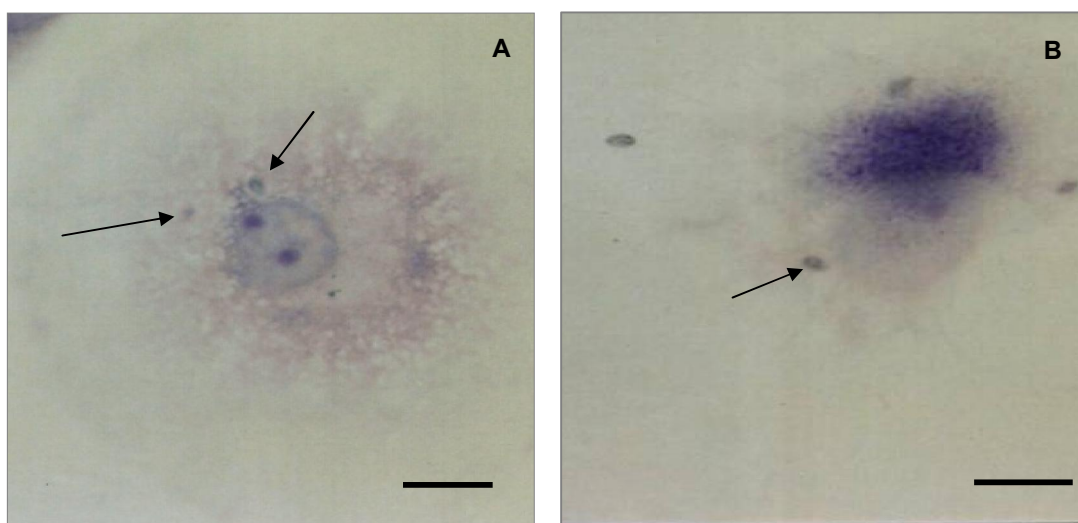


Figura 12 – Fotomicrografia óptica da interação de APCs com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 1:1, por 1 hora, a 37°C. **A** – Macrófago do doador D3 apresentando conídios no interior de vacúolos ( —▶ ); **B**- Célula dendrítica do doador D4 com conídio do fungo internalizado ao citoplasma (—▶). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.

Com 6 horas de interação, tanto para a concentração 1:1 quanto 3:1, foi observado um aumento de formação de estruturas semelhantes a endossomos contendo conídios no interior das APCs e algumas células fúngicas

começaram a dilatar-se (Figuras 13A e 13B). E, mais uma vez, não houve diferença no comportamento das células dos dois doadores estudados.

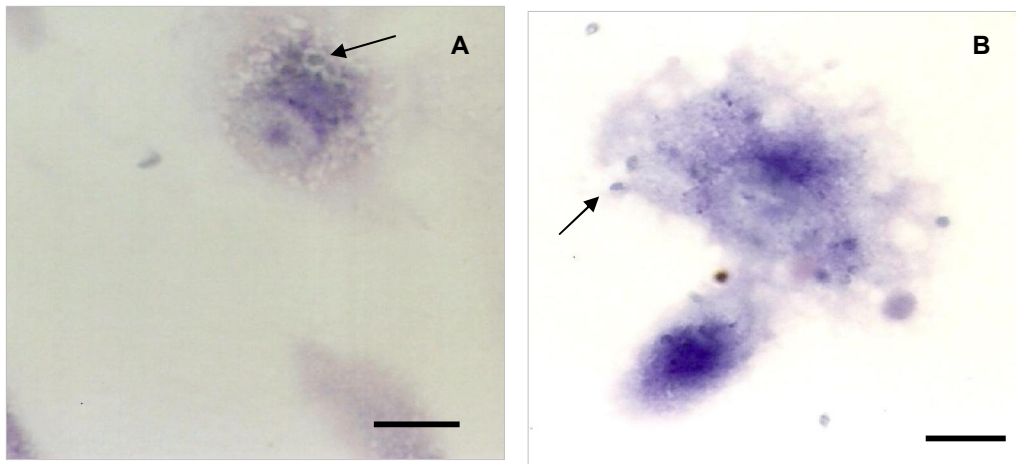


Figura 13 – Fotomicrografia óptica da interação de APCs com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 1:1, por 6 horas, a 37°C. **A** – Macrófago do doador D3 apresentando conídios dilatados no interior de vacúolos ( → ); **B**- Célula dendrítica do doador D4 com conídio no interior de vacúolo ( → ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.

Com 24 horas de interação, em ambas as concentrações de conídios de *P. lilacinus* avaliadas, foram observados no interior das APCs conídios

dilatados, com tubos germinativos e hifas, sem diferenças entre os doadores (Figura 14).

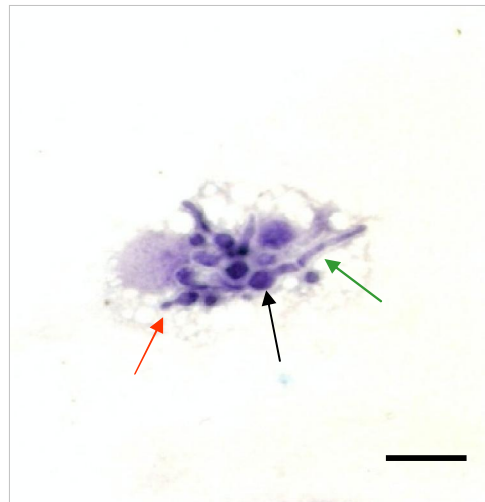


Figura 14 – Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos do doador D3 com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 1:1, por 24 horas, a 37°C. Observa-se conídios dilatados ( —→ ); tubo germinativo ( —→ ); hifa septada ( —→ ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.

Os macrófagos dos doadores D3 e D4 apresentaram conídios bastante dilatados em seu interior com vários tubos germinativos e algumas dessas

células humanas já apresentavam micélio em pleno desenvolvimento culminando na destruição das mesmas (Figura 15A e 15B).

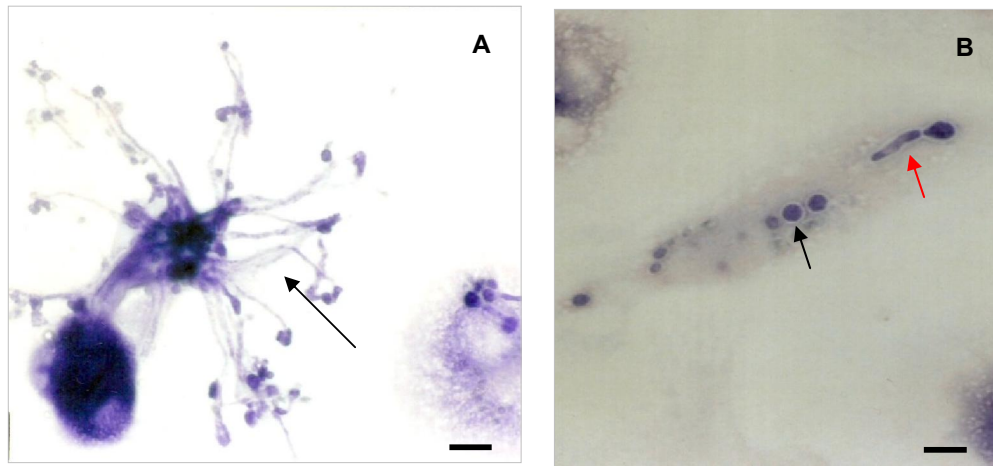


Figura 15 – Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 3:1, por 24 horas, a 37°C. **A-** Célula fagocítica do doador D3 destruída pela proliferação do micélio fúngico ( —→ ); **B-** Célula fagocítica do doador D4 apresentando conídio dilatado ( —→ ) e tubo germinativo ( —→ ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.

As células dendríticas do doador D3 apresentaram conídios dilatados em seu interior com tubos germinativos (Figura 16), porém raras foram as células

apresentando micélio. Diferentemente do que foi observado para as células dendríticas do doador D4, onde micélio pode ser visto facilmente (Figura 17).

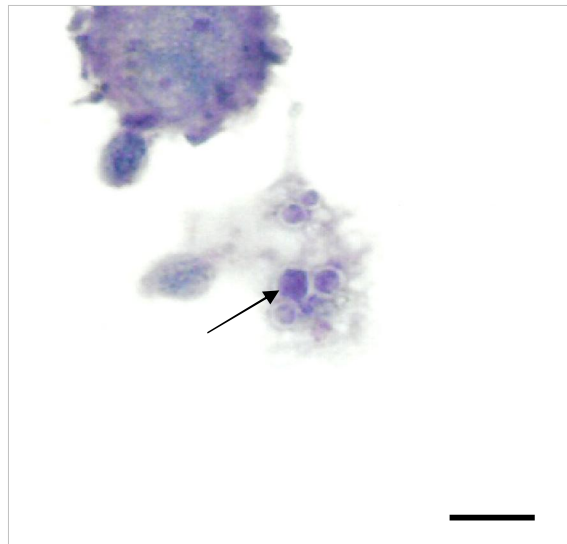


Figura 16 – Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas do doador D3 com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 1:1, por 24 horas, a 37°C. Observa-se conídio dilatado com tubo germinativo ( → ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.



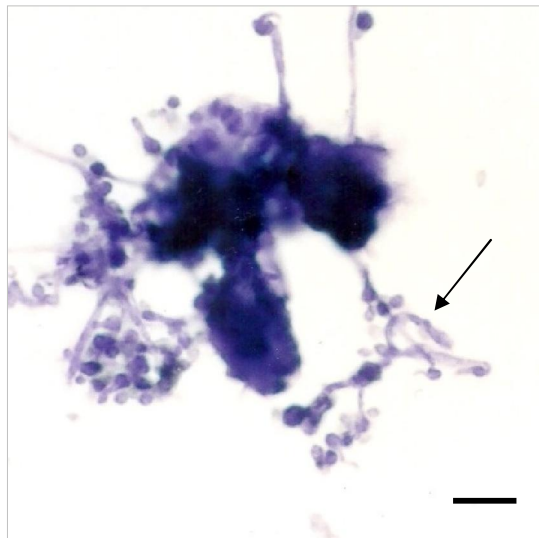


Figura 17 – Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas do doador D4 com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 3:1, por 24 horas, a 37°C. Observa-se micélio fúngico em proliferação (→). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.

As APCs do grupo controle apresentaram morfologia característica, como descrita no item 5.3 (Figura 18A e 18B).

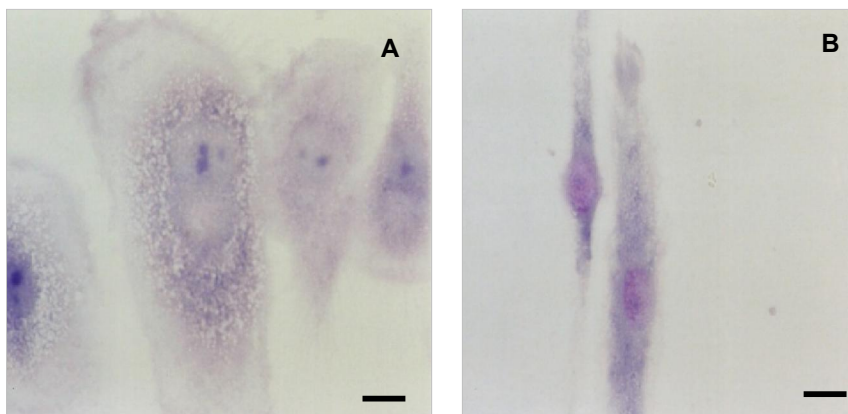


Figura 18. Fotomicrografia óptica de APCs, doador D3, grupo controle, derivados de monócitos isolados de sangue periférico aos 10 dias de cultura. **A-** Macrófago; **B-** Célula dendrítica. Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10  $\mu$ m.

A análise quantitativa da interação das APCs com os conídios na concentração de 1:1 (conídio:célula) foi realizada apenas no tempo de 6 horas, pois nesse tempo de interação os conídios se apresentavam dilatados e no interior de estruturas semelhantes a fagossomos, não havendo dúvida do processo fagocítico. O percentual de células infectadas do doador D3 foi de 25% para os macrófagos e 13% para as células dendríticas. As células do doador D4 apresentaram 26% de macrófagos infectados e 25,9% de células dendríticas infectadas (Figura 19). Não houve diferenças significativas entre o percentual fagocítico dos macrófagos e células dendríticas de cada doador (D3:  $P= 1,22$  e D4:  $P= 1,0$ ), como também entre os doadores (MØ:  $P= 0,61$  e DC:  $P= 1,81$ ).

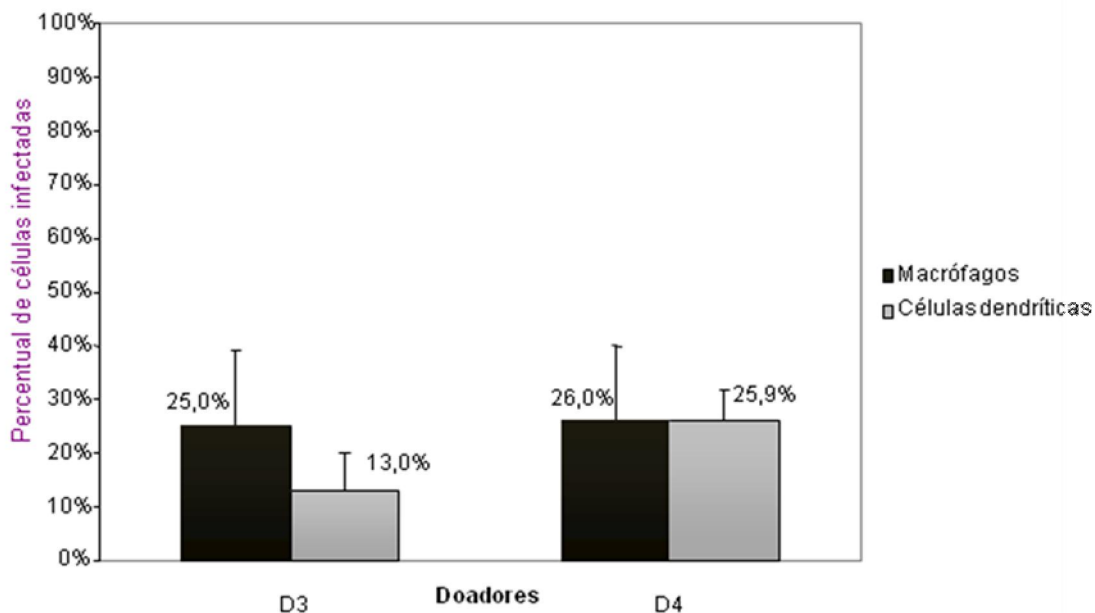


Figura 19 - Percentual de macrófagos e células dendríticas infectadas, de dois doadores D3 e D4, durante interação com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 1:1, por 6 horas, a 37°C.

Quando as células fagocíticas humanas interagiram com os conídios na concentração de 3:1 (conídio:célula), por 6 horas, o percentual de macrófagos infectados aumentou, 64% do doador D3 e 44% do doador D4, com relação aos percentuais de infecção dos mesmos doadores frente a conídios na concentração 1:1. Com relação as células dendríticas, o número de células infectadas, 24% para o doador D3, aumentou praticamente 50% em relação ao percentual de DCs infectadas quando frente a concentração de conídios 1:1, mas por outro lado para o doador D4, houve uma diminuição nesse percentual,

17% de DCs infectadas (Figura 20). Não houve diferenças significativas entre os macrófagos e células dendríticas de cada doador (D3:  $P= 9,3$  e D4:  $P= 4,3$ ) como também entre os doadores (MØ:  $P= 5,1$  e DC:  $P= 8,55$ ).

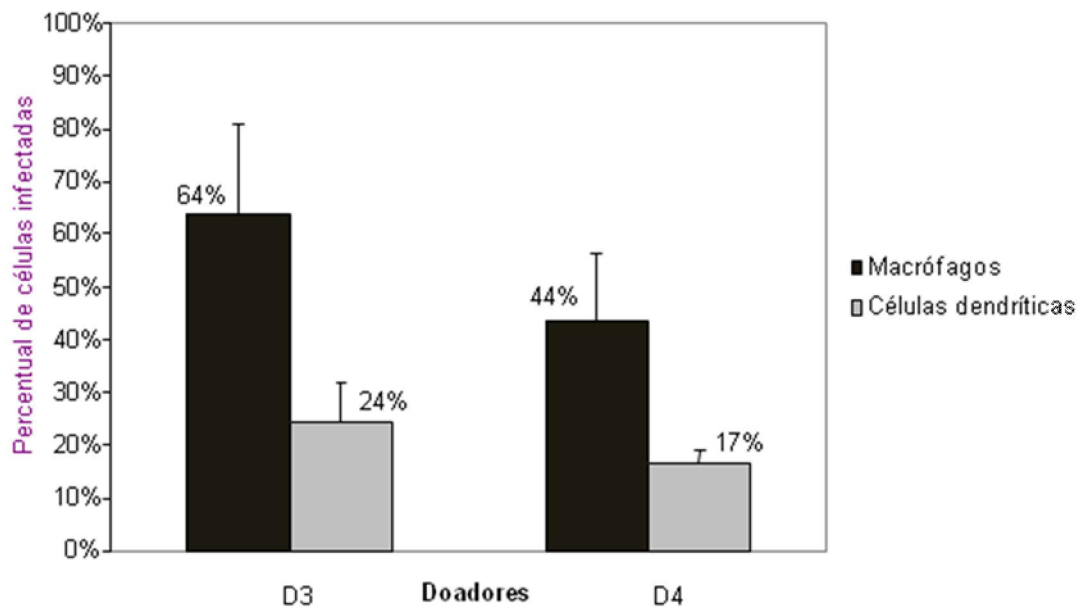


Figura 20 - Percentual de macrófagos e células dendríticas infectadas, de dois doadores D3 e D4, durante interação com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, concentração 3:1, por 6 horas, a 37°C.

No tempo de 24 horas de interação das APCs com o fungo, em ambas as concentrações (1:1 e 3:1), a presença de tubos germinativos e hifas impossibilitou a quantificação das células humanas infectadas.

### **5.3.3. Interação das APCs com conídios de *P. lilacinus* em Labteks® com e sem L-Name e em tubos de poliestireno para citometria de fluxo**

#### **5.3.3.1. APCs x conídios de *P. lilacinus* em Labteks®**

Macrófagos e células dendríticas dos doadores D5, D6, D7 e D8 interagiram com os conídios fúngicos, em Labteks®, na ausência e presença de L-Name, um conhecido inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), enzima responsável pela produção de óxido nítrico (NO), com objetivo de investigar de forma indireta, a influência do NO produzido pela célula hospedeira na interação de *P. lilacinus* com as APCs.

As APCs interagiram com os conídios do fungo nas concentrações 1:1 e 3:1 (conídio:célula), nos tempos de incubação de 6 e 24 horas. No tempo de 6 horas de interação, não foi possível realizar a avaliação por problemas de contaminação.

O tempo de incubação de 1 hora, realizado nos experimentos anteriores, foi retirado, devido à impossibilidade de certificação da internalização de alguns conídios pelas APCs. Portanto, para os demais ensaios foram escolhidos os tempos de 6 e 24 horas.

Os resultados mostraram que a interação de conídios de *P. lilacinus* com as APCs ocorreu de forma semelhante aos experimentos anteriores e sem diferenças entre as células dos doadores utilizadas.

De modo a exemplificar apresentamos os resultados dos doadores D5 e D6. Com 24 horas de interação dos conídios, na concentração de 1:1 (conídio:célula), com macrófagos (Figura 21) e células dendríticas (Figura 22) foi observado que as células fúngicas apresentaram-se dilatadas, e produzindo

tubos germinativos e hifas que romperam a membrana celular culminando no aparecimento do micélio, tanto nas lâminas sem L-Name quanto nas com L-Name. Na avaliação qualitativa foram observados vários estágios de desenvolvimento do fungo ocorrendo ao mesmo tempo no interior das APCs.

Não foram observados resultados divergentes, dos descritos acima, quando utilizada a concentração de 3:1 (conídio:célula) (dados não mostrados).

Em relação à avaliação quantitativa, o número de células infectadas não foi calculado nesse período de interação (24h), porque uma vez formado o micélio é impossível a quantificação de células.

As APCs do grupo controle com e sem L-Name apresentaram morfologia característica, como descrita no item 5.3 (dados não mostrados).

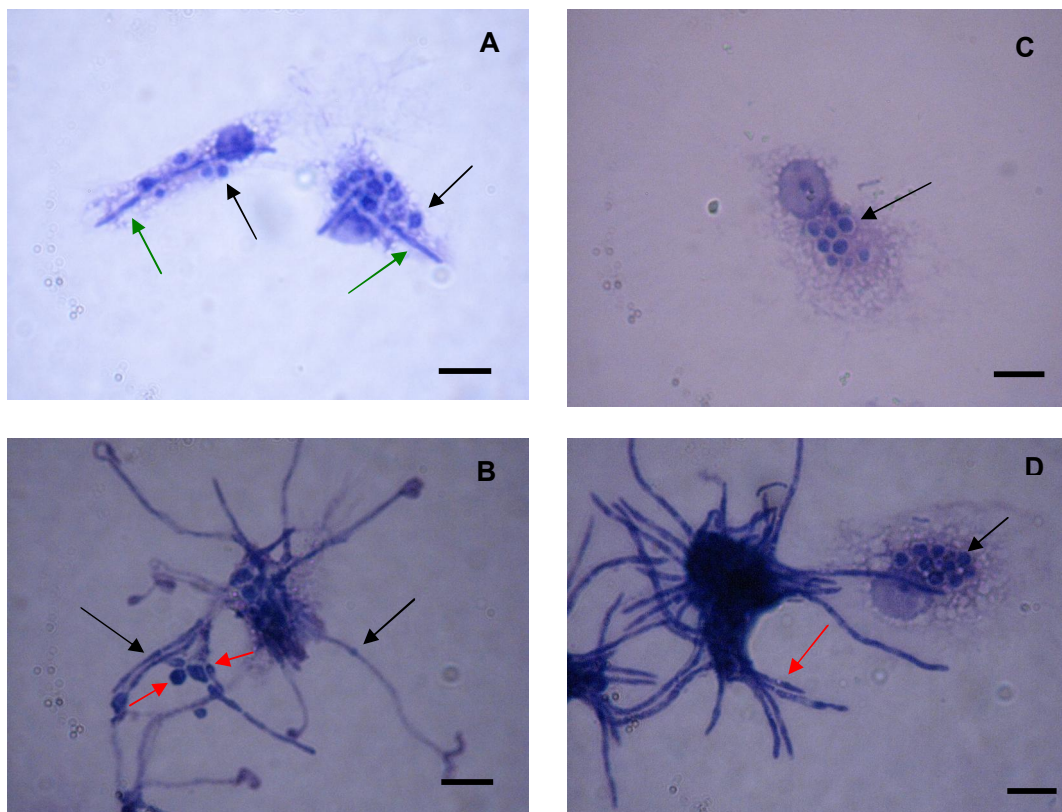


Figura 21 – Fotomicrografia óptica da interação de macrófagos com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, na concentração de 1:1 (conídio:célula), por 24 horas, a 37°C. **A-** Célula fagocítica do doador D5, na ausência de L-Name, apresentando conídios dilatados em seu interior ( —→ ) e hifas rompendo a membrana celular ( —→); **B-** Célula fagocítica do doador D6, na ausência de L-Name, apresentando conídios dilatados ( —→ ), e hifas ( —→ ); **C-** Célula fagocítica do doador D5, na presença de L-Name, apresentando conídios dilatados ( —→ ); **D-** Célula fagocítica do doador D6, na presença de L-Name, apresentando conídios dilatados ( —→ ) e micélio em proliferação ( —→ ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.



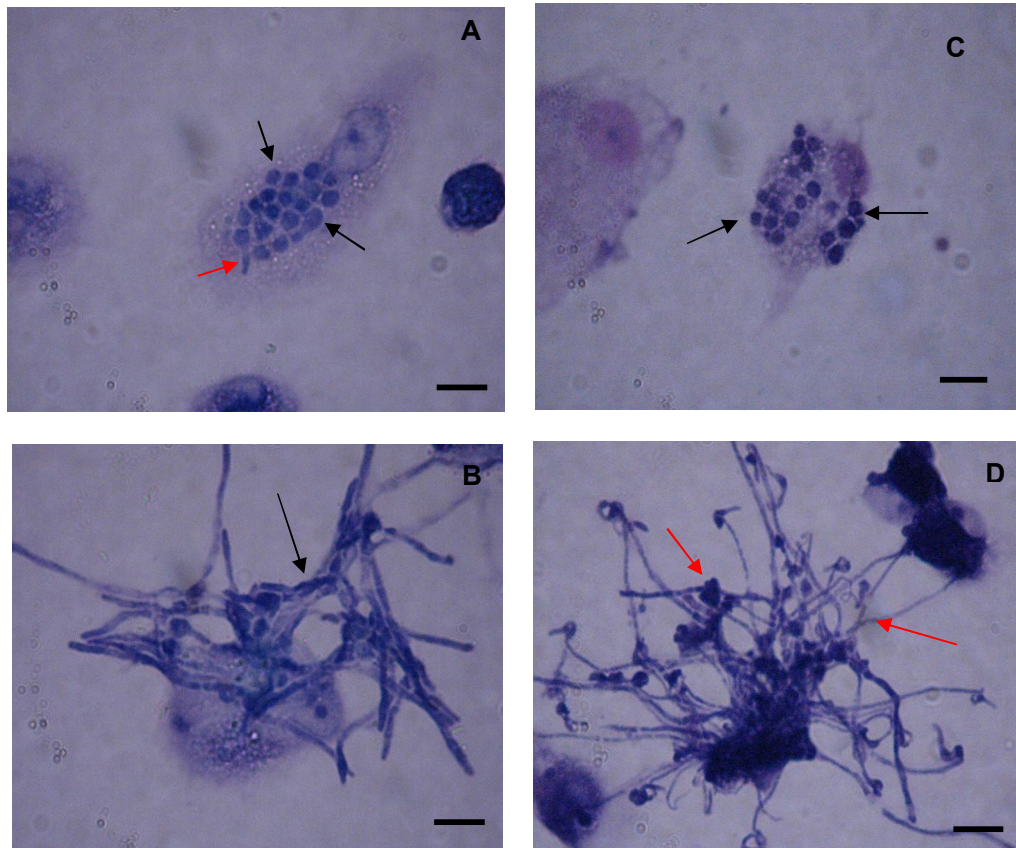


Figura 22 – Fotomicrografia óptica da interação de células dendríticas com conídios de *Paecilomyces lilacinus*, na concentração de 1:1 (conídio:célula), por 24 horas, a 37°C. **A-** Célula fagocítica do doador D5, na ausência de L-Name, apresentando conídios dilatados em seu interior ( → ) e tubo germinativo ( → ); **B-** Célula fagocítica, do doador D6, na ausência de L-Name, apresentando micélio em proliferação ( → ); **C-** Célula fagocítica do doador D5, na presença de L-Name, apresentando conídios dilatados em seu interior ( → ); **D-** Célula fagocítica do doador D6, na presença de L-Name, apresentando micélio em proliferação ( → ). Coloração Giemsa. Aumento original 1000x; — = 10 µm.



### **5.3.3.2. Percentual de APCs expressando moléculas de superfície (CD14, B7-1 e DC-SIGN) por citometria de fluxo**

Macrófagos e células dendríticas dos doadores D5, D6, D7 e D8 interagiram com os conídios fúngicos, em tubos de poliestireno. As APCs interagiram com os conídios do fungo somente na concentração 1:1 (conídio:célula), uma vez que nos ensaios anteriores não observamos diferenças estatisticamente significantes em relação a concentração 3:1. Os tempos de incubação foram de 6 e 24 horas e posteriormente, foram processadas para marcação de superfície celular com anticorpos específicos como anti-CD-14-FITC, anti-B7.1-FITC, anti-CD209 (DC-SIGN)-PerCP-Cy (conforme descrito na metodologia) e analisados em citômetro de fluxo. A análise referente a interação do fungo com as APCs no tempo de 6 horas e, também, dos doadores D7 e D8 no tempo de 24 horas não apresentaram resultados consistentes, portanto, não foram incluídos no presente estudo.

A figura 23 apresenta o gráfico representativo da análise das células por citometria de fluxo onde as características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) foram utilizadas para distinguir cada população celular e definir as regiões para avaliar as APCs. A análise do perfil das células mostra uma população típica de monócitos (Mo) e, portanto, as APCs aqui estudadas foram analisadas na região R1.

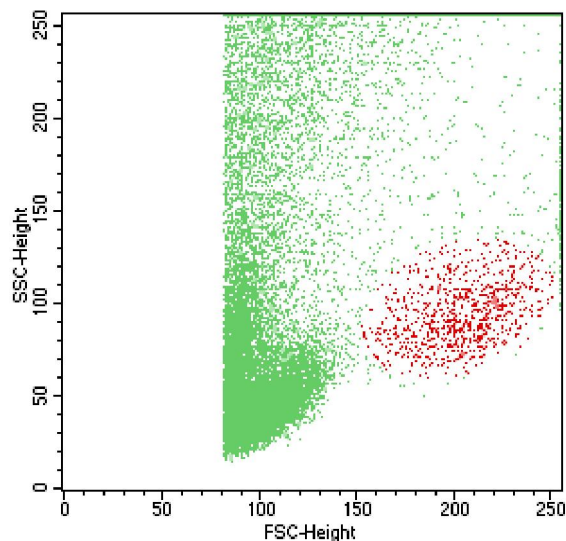


Figura 23- Gráfico representativo da região R1 (em vermelho) onde foram analisadas a população de macrófagos e células dendríticas.

As figuras 24 e 25 apresentam as médias dos percentuais de células fluorescentes dos diferentes doadores analisados comparando-se as situações – teste (APCs + *P. lilacinus* na concentração 1:1) em relação à expressão espontânea de CD14, DC-SIGN e B7.1 na superfície das APCs (controle).

Nossos resultados demonstraram que a percentagem de macrófagos positivos para o marcador CD14 foi semelhante tanto para os macrófagos sem a presença do fungo (controle) (43%) quanto para os mesmos interagindo com *P. lilacinus* (41,6%) e, em conformidade com a literatura, a expressão de CD14 está confinada a macrófagos.

Com relação aos marcadores B7.1 e DC-SIGN verificamos que os macrófagos infectados por *P. lilacinus* esses marcadores se apresentaram em

maior quantidade, 65,6% e 45,8%, respectivamente, quando comparados aos controles (11,6% - B7.1; 0,7%-DC-SIGN) (Figura 24).

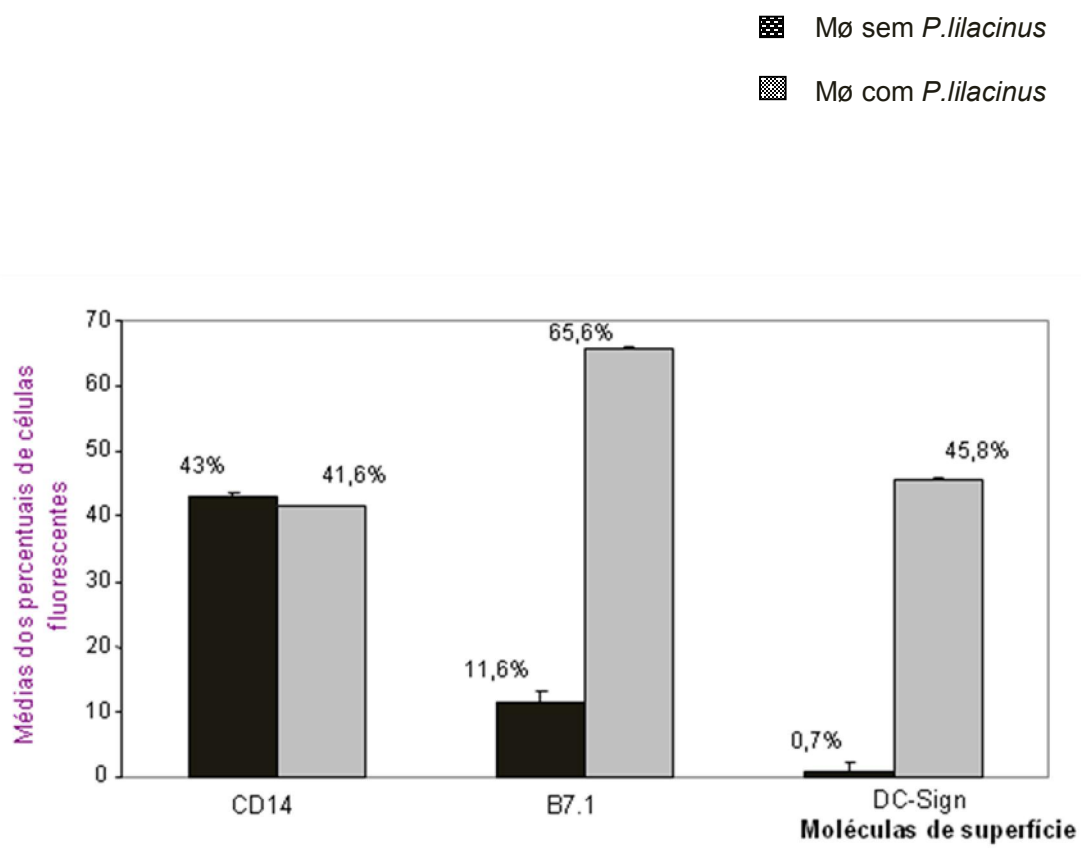


Figura 24- Média dos percentuais de macrófagos dos doadores D5 e D6 apresentando fluorescência para as moléculas de superfície, CD14, B7.1 e DC-SIGN, na presença e ausência de conídios de *Paecilomyces lilacinus* na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 24 horas de incubação.

As células dendríticas apresentaram fraca positividade para o marcador CD14 (17,5%; também em conformidade com a literatura), porém o percentual de DCs expressando esse marcador foi um pouco maior na presença do fungo (20,4%) do que no controle (17,5%). Para os marcadores B7.1 e DC-SIGN os resultados demonstraram que o percentual das DCs expressando esses marcadores é naturalmente alto, 54,3% e 32,4%, respectivamente. No entanto, quando interagindo com o fungo o percentual de células aumentou para 61,7% para B7.1 e 43,7% para DC-SIGN (Figura 25).

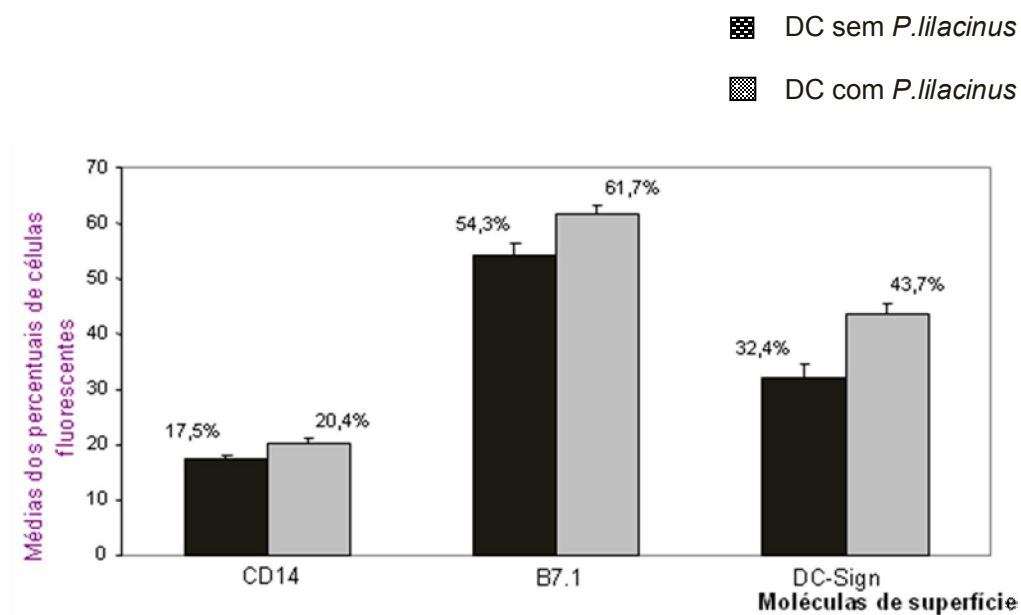


Figura 25 - Média dos percentuais de células dendríticas dos doadores D5 e D6 apresentando fluorescência para as moléculas de superfície, CD14, B7.1 e DC-SIGN, na presença e ausência de conídios de *Paecilomyces lilacinus* na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 24 horas de incubação.

A análise dos tubos-controle (PMA) foi prejudicada, pois estes tubos foram contaminados. Mas, de qualquer forma, o Labiopac tem relatos de positividade de expressão de CD14, B7.1 e DC-SIGN na presença de PMA (dados não mostrados).

#### **5.3.4. Análise da produção de citocinas, IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ , por macrófagos e células dendríticas interagindo com *P. lilacinus***

Os sobrenadantes provenientes da interação de macrófagos e células dendríticas dos doadores D7 e D8 com os conídios fúngicos, na concentração 1:1 (conídio:célula), em Labteks®, nos tempos de 6 e 24 horas foram coletados com o objetivo de investigar a produção de citocinas, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Controles positivos da reação foram feitos utilizando PMA para a estimulação da produção de citocinas nas APCs.

Os sobrenadantes da interação das células dendríticas com os conídios, no tempo de 24 horas, não foram analisados devido a problemas de contaminação.

A figura 26 apresenta os resultados das médias dos níveis de secreção de IL1- $\beta$  dos macrófagos desafiados com os conídios do fungo, nos tempos de 6 e 24 horas de incubação. Os macrófagos interagindo com o fungo apresentaram aumento na produção da citocina (312 pg/ml em 6 horas; 263 pg/ml em 24 horas) quando comparado aos macrófagos na ausência do fungo (controle – 98pg/ml em 6 horas; 166 pg/ml em 24 horas) e estimulados com PMA (175 pg/ml).

As células dendríticas dos doadores interagindo com o fungo, no tempo de 6 horas (Figura 27), apresentaram níveis de IL1- $\beta$  (346 pg/ml) semelhantes aos encontrados quando as DCs foram estimuladas com PMA (338 pg/ml) e em quantidades maiores que o controle (DC na ausência do fungo – 168 pg/ml).

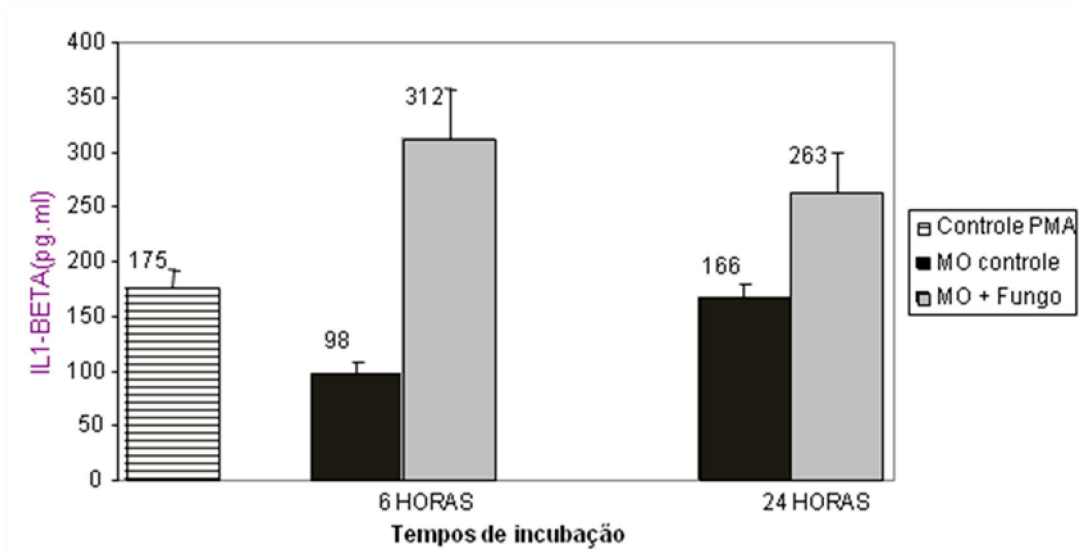


Figura 26 – Médias dos níveis de secreção de IL1- $\beta$  de macrófagos dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de *Paecilomyces lilacinus* na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 e 24 horas de incubação.

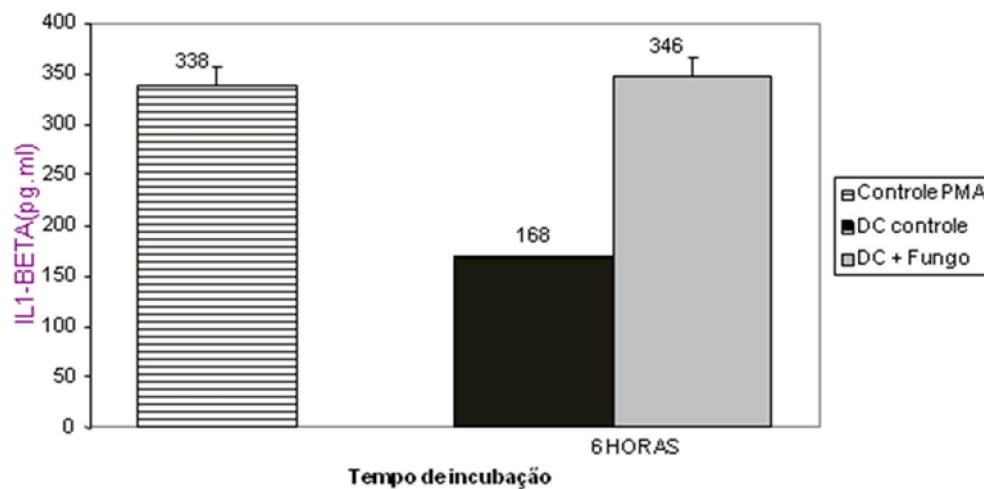


Figura 27 – Médias dos níveis de secreção de IL1- $\beta$  de células dendríticas dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de *Paecilomyces lilacinus* na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 horas de incubação.

A figura 28 apresenta os resultados das médias dos níveis de secreção de TNF- $\alpha$  dos macrófagos interagindo com os conídios de *P. lilacinus*, nos tempos de 6 e 24 horas. Os macrófagos incubados com o fungo apresentaram níveis baixos de TNF- $\alpha$ , em ambos os tempos, 0,08 e 0,09 pg/ml, respectivamente, quando comparados com o controle e também com as células estimuladas com PMA. Assim como os macrófagos as células dendríticas interagindo com o fungo também apresentaram níveis baixos dessa citocina, no tempo de 6 horas de incubação, (Figura 29), diferentemente do que foi observado para as DCs estimuladas com PMA (292 pg/ml).

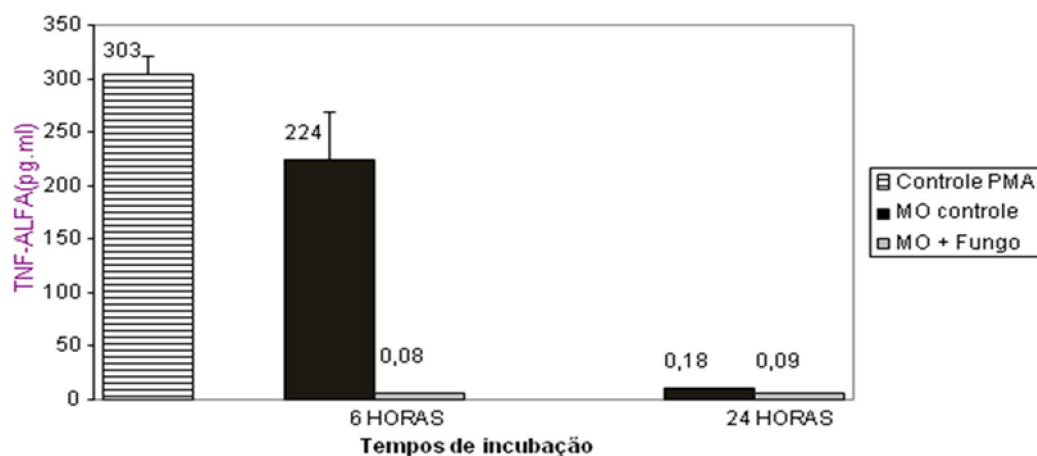


Figura 28 – Médias dos níveis de secreção de TNF- $\alpha$  de macrófagos dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de *Paecilomyces lilacinus* na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 e 24 horas de incubação.

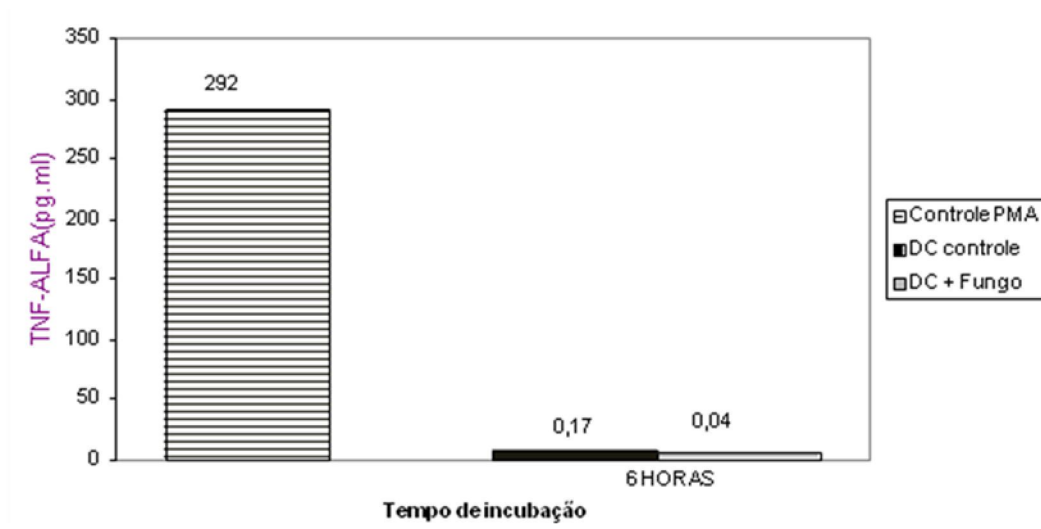


Figura 29 – Médias dos níveis de secreção de TNF- $\alpha$  de células dendríticas dos doadores D7 e D8 na presença e ausência de conídios de *Paecilomyces lilacinus* na concentração de 1:1 (conídio:célula), no tempo de 6 horas de incubação.



## 6 DISCUSSÃO

As infecções invasivas devido a fungos filamentosos estão recebendo a cada dia maior importância por causar morbidade e mortalidade em pacientes, principalmente, comprometidos imunologicamente (Pfaller & Diekema, 2004). Fungos como *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium marneffe* tem recebido maior atenção no que diz respeito aos estudos investigativos sobre interação com células fagocíticas e as respostas advindas a esse processo (Brakhage *et al.*, 2010; Roilides *et al.*, 2003).

*Paecilomyces lilacinus* é considerado um fungo oportunista humano, emergente, capaz de causar severas infecções cutâneas e subcutâneas e, principalmente, oculomicoses resultando na enucleação do globo ocular. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos científicos relacionados a esse fungo trata-se de apresentação de casos clínicos e seus respectivos tratamentos. Não existem trabalhos sobre a interação *in vitro* dessa espécie com células humanas de acordo com os levantamentos científicos por nós realizados.

No presente trabalho foi utilizado um isolado de *P. lilacinus* proveniente de um paciente com hialohifomicose de seio nasal. Durante as avaliações macro e micromorfológicas foi verificado que o isolado apresentou características típicas da espécie, como descrito por Luangsa-ard *et al.* (2011), com intensa produção de conídios aos 14 dias de cultivo em meio adequado. Essa característica biológica, facilidade em produzir grandes quantidades de conídios, pode ter conferido a esse isolado vantagens no processo de infecção do hospedeiro, primeiro pela maior dispersão de seus esporos no ambiente, e

segundo pela provável capacidade de produzir estruturas semelhantes à fiálides e conídios no tecido (esporulação adventícia), além de hifas septadas e hialinas facilitando, segundo autores, a disseminação do fungo no corpo do hospedeiro (Liu *et al.*, 1998; Pastor & Guarro, 2006).

Para investigar a interação de macrófagos e células dendríticas humanas (APCs) frente ao isolado de *P. lilacinus*, utilizamos conídios isolados do fungo e APCs humanas de doadores saudáveis em diferentes concentrações *in vitro*.

No experimento, piloto, observamos que conídios de *P. lilacinus* interagiram com os macrófagos e células dendríticas humanas nas proporções de (2:1 e 5:1, conídio:APC) no período de 3 horas de incubação. As APCs fagocitaram os conídios com sucesso, sem diferenças significativas entre elas quanto à quantificação de células fúngicas, na concentração de 2:1, no interior dos fagócitos. Na concentração de 5:1 a contagem foi dificultada pela grande quantidade de conídios no exterior e interior das células humanas. Deste modo, foi determinado que concentrações menores do que 5:1 de conídios em relação às células fagocíticas poderiam ser usadas para que o processo de internalização dos mesmos e as etapas posteriores da interação fossem visualizadas mais detalhadamente. Em modelo murino Peixoto *et al.* (2010) estudando a interação de conídios de *P. lilacinus* com macrófagos peritoneais, *in vitro*, e tomando como pressuposto os dados da literatura que mostram que esse fungo possui baixa virulência (Pastor & Guarro, 2006) e acreditando, incorretamente, que os macrófagos murinos seriam capazes de impedir a germinação dos conídios e facilmente os matariam após o processo fagocítico, utilizaram a concentração de 2:1 (conídio:macrófago murino) para o desafio

dos fagócitos. Surpreendentemente, esses autores verificaram que o fungo foi capaz de infectar os macrófagos, *in vitro*, e matá-los em 24 horas de interação, demonstrando a capacidade invasiva e patogênica dos isolados estudados.

No nosso estudo, os dados da interação utilizando as proporções de 1:1 e 3:1 de APC e fungo, no tempo de 1 hora de interação demonstraram que os conídios já se encontravam no interior dos macrófagos. O mesmo foi observado para outros fungos como *Pe. marneffe*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* e *Verticillium nigrescens* (Rongrungruang & Levitz 1999; Winn *et al.*, 2003). Mais recentemente, um estudo mostrou que a fagocitose e a morte intracelular de *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus* e *A. flavus* por macrófagos e células dendríticas humanas ocorria já com 30 minutos de interação em todas as espécies estudadas (Perkhofer *et al.*, 2007). No entanto, dados discordantes foram obtidos por Robertson *et al.* (1987) quando incubaram conídios de *A. fumigatus* e *Pe. ochrochloron* com monócitos e células polimorfonucleares humanas, por 1 hora, pois verificaram que os conídios nesse período, em sua maioria, encontravam-se apenas associados às células, sendo difícil distinguir entre conídios aderidos às células daqueles fagocitados quando observados por microscopia óptica. A discordância dos dados entre autores pode ser devido à diferença no processo de avaliação do que foi considerado fagocitose. Robertson *et al.* (1987) levantam a questão de que só se pode inferir a uma partícula a denominação de “fagocitada” se ela tiver passado pelas duas fases do processo de fagocitose: a) adesão da partícula à superfície da célula fagocítica; b) ingestão da partícula pela célula fagocítica. No nosso trabalho foi possível confirmar a internalização dos conídios de *P. lilacinus* pelas APCs

devido a visualização de estruturas semelhantes a fagossomos contendo o fungo.

No decorrer da interação dos conídios fúngicos com as APCs investigadas no presente trabalho, foi observado que no tempo de 6 horas de incubação, em ambas as concentrações (conídio:APC) utilizadas, a internalização de células fúngicas aumentou e alguns conídios começaram a se dilatar demonstrando a grande atividade metabólica da célula fúngica nesse período. Segundo Latgé (1999) a dilatação de conídios é um pré-requisito, e etapa importante, para o desenvolvimento de hifas. Além disso, o mesmo autor mostrou que o percentual de morte de conídios de *A. fumigatus* fagocitados por macrófagos diminui quando eles começam a se dilatar, inclusive testes de sensibilidade de conídios dilatados desse fungo demonstraram que os mesmos são mais resistentes que conídios latentes. Também foi comprovado que conídios de *A. fumigatus* podem germinar no interior de monócitos sugerindo que uma segunda linha de defesa de células fagocíticas, os neutrófilos, sejam importantes na contenção de conídios que resistem à morte intracelular por monócitos (Schaffner *et al.*, 1982; Schaffner *et al.*, 1983; Washburn *et al.*, 1987). Assim como nos nossos resultados com *P. lilacinus*, a interação de monócitos humanos com conídios de *A. fumigatus* por 6 horas também ocorre a dilatação, ao longo do tempo de interação, dos conídios no interior das células fagocíticas (Loeffler *et al.*, 2009). Com relação às células dendríticas também já foi demonstrado que as mesmas fagocitam conídios de *A. fumigatus* (Gafa *et al.*, 2007) e, de modo semelhante, conídios latentes, conídios dilatados e hifas de *A. fumigatus* são fagocitados. Entretanto, os conídios são menos susceptíveis que as hifas (Bozza *et al.*, 2002).

No nosso trabalho, com o aumento do tempo de incubação dos conídios de *P. lilacinus* com as APCs, para 24 horas, as células fagocíticas humanas apresentaram, em ambas as concentrações de conídio por célula fagocítica, conídios dilatados com tubos germinativos. *Fusarium solani*, uma das espécies fenotipicamente relacionada ao *Purpureocillium lilacinum*, espécie atualmente proposta como novo nome para *Paecilomyces lilacinus* (Luangsa-ard *et al.* 2011), foi fagocitado por macrófagos derivados de monócitos isolados de sangue periférico humano e após 24 horas os conídios produziram tubos germinativos (Vieira, 2008), semelhantes aos encontrados nesse estudo. Os tubos germinativos, observados aqui, se desenvolveram formando hifas septadas que romperam a membrana dos fagócitos culminando na destruição dessas células e surgimento de um micélio.

Nos nossos ensaios de interação, observamos pequenas diferenças entre as APCs provenientes dos doadores, visto que as células dendríticas de um dos doadores não apresentaram grandes quantidades de hifas se ramificando em micélio, apenas hifas septadas, isoladas foram vistas. Entretanto, não consideramos essa diferença relevante, mas sim, muito provavelmente, relacionada à variabilidade genética das células entre os doadores. Mesmo porque, apesar da não visualização de um micélio abundante para as células em questão, verificamos que o isolado de *P. lilacinus* utilizado estava viável e ativo no interior das APCs de todos os doadores, evadindo os mecanismos de defesa inato dessas células por mecanismos ainda desconhecidos.

Dependendo da espécie ou mesmo da fase do desenvolvimento do fungo e das células que participam das defesas do hospedeiro, dados

diferentes de interação são observados. A interação, por 24 horas, de conídios e formas de leveduras de *Pe. marneffe* com neutrófilos mostrou que os conídios resistiram à morte, enquanto as formas de levedura não (Kudeken *et al.*, 2000). Assim como os macrófagos, os neutrófilos desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções, entretanto para determinados fungos como *Cryptococcus neoformans*, eles são recrutados ao sítio da infecção, mas não tem um papel protetor, enquanto que para infecções pulmonares causadas por *Aspergillus* sp. os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa (Noverr *et al.*, 2006). Macrófagos interagindo com conídios de diferentes espécies de *Aspergillus* foram capazes de fagocitá-los e matá-los após 2 horas de incubação (Perkhofer *et al.*, 2007). Schaffner *et al.* (1982) verificaram que conídios de *A. fumigatus* foram fagocitados por macrófagos que impediram a sua germinação, matando as células fúngicas em 48 horas de incubação. Por outro lado, Robertson *et al.* (1987) descreveram que monócitos e leucócitos polimorfonucleares humanos foram capazes de fagocitar conídios de *Pe. ochrochloron*, mas conídios de *A. fumigatus* permaneceram associados à membrana dos fagócitos.

Como citado anteriormente, estudos sobre a interação de *P. lilacinus* com células fagocíticas humanas são inexistentes e o nosso trabalho é pioneiro. Até o presente momento foi realizado apenas um estudo, pelo nosso grupo, com essa espécie utilizando macrófagos peritoneais murinos (Peixoto *et al.*, 2010) e os resultados foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho. Mazet *et al.* (1994) investigaram a interação entre *P. farinosus* com neutrófilos equinos e verificaram que as células fúngicas foram internalizadas após 1 hora de incubação resultando em um micélio limitado à monocamada de neutrófilos

após 16 horas. Esses dados demonstram, claramente, a capacidade invasiva do gênero para células fagocíticas durante experimentos *in vitro*. Se tais observações *in vitro* refletem os mecanismos que ocorrem *in vivo* ainda não sabemos e necessitam ser esclarecidos.

A análise quantitativa da interação das APCs foi realizada no período de incubação de 6 horas, pelo fato de observarmos estruturas semelhantes a fagossomos, não havendo dúvidas do processo fagocítico e também maior atividade metabólica do conídio e, conseqüentemente, maior probabilidade dele permanecer viável e formar hifas no interior do fagócito. Foi verificado que não houve diferenças significativas entre o percentual fagocítico das APCs de cada doador, como também entre os doadores. O que nos leva a ressaltar que assim como os macrófagos são células que eficientemente reconhecem e fagocitam patógenos fúngicos, as células dendríticas são também altamente fagocíticas e podem fagocitar e degradar *Histoplasma capsulatum*, *C. neoformans*, *Candida albicans*, *A. fumigatus* (Noverr *et al.*, 2006) e diante dos nossos resultados *P. lilacinus*.

Depois de analisarmos a interação de conídios de *P. lilacinus* com APCs por 1, 6 e 24 horas, elegemos os tempos de 6 e 24 horas para os demais experimentos, visto que o conídio a partir de 6 horas de interação com as células apresenta sinais de plena atividade não demonstrando susceptibilidade frente aos possíveis mecanismos de defesa das células fagocíticas utilizadas nesse estudo.

Vieira (2008) além de demonstrar, experimentalmente, a infecção de macrófagos humanos por *F. solani*, também mostrou que macrófagos inativados pelo L-Name (inibidor de NO-sintase, ou seja, inibe óxido nítrico)

foram, visivelmente, mais permissivos à infecção por esse patógeno. Dessa forma, achamos relevante investigar de forma indireta a influência do óxido nítrico na interação de *P. lilacinus* com as APCs interagindo conídios do fungo, em ambas as concentrações (1:1 e 3:1), com as células fagocíticas, na presença e ausência de L-Name. Nossos resultados mostraram que não houve diferença entre as APCs interagindo com os conídios fúngicos na presença ou ausência de L-Name no tempo de 24 horas, em ambas as concentrações de conídio por célula. Os conídios foram capazes de germinar formando hifas que se ramificaram, dando origem a um micélio dentro das APCs, com e sem o inibidor, sugerindo que os mecanismos oxidativos, relacionados ao óxido nítrico, da resposta celular frente a *P. lilacinus* podem não ser eficientes para a degradação de suas células ou as APCs não produzem óxido nítrico mediante a interação com *P. lilacinus*. Adicionalmente, estudo sobre a interação de células leveduriformes e conídios de *Pe. marneffe* com a linhagem macrofágica J774 demonstrou que ambas as formas fúngicas foram internalizadas pela célula fagocítica e danificadas quando as mesmas foram estimuladas a produzir óxido nítrico e intermediários de nitrogênio reativo (Cogliati *et al.*, 1997). Da mesma forma, relatos de inibição de crescimento de conídios e leveduras, no interior de macrófagos murinos, de diferentes fungos, como *C. neoformans*, *Histoplasma. capsulatum*, *C. albicans*, *Pneumocystis carinii* e *Rhizopus* spp. já foram demonstrados (Granger *et al.*, 1988; Lane *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1994; Blasi *et al.*, 1995; Ishimine *et al.*, 1995; Jorens *et al.*, 1995). Outra investigação com o fungo *Pe. manerffe* demonstrou que células leveduriformes foram mais susceptíveis ao óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos do que conídios (Kudeken *et al.*, 1998). Por outro lado,



óxido nítrico não parece estar envolvido na atividade fungicida de macrófagos alveolares murinos e humanos contra *A. fumigatus* (Michaliszyn *et al.*, 1995). Sendo assim, mais estudos são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos pelos quais as células fagocíticas humanas realizam para o controle do crescimento de *P. lilacinus*.

Vale ressaltar que durante o processo de latência e germinação de conídios, e mesmo nas formas hifais, são expressas diferentes moléculas antigênicas na superfície das células fúngicas que podem estimular diferentes células e, conseqüentemente, induzir diferentes tipos de respostas no hospedeiro (Schaffner *et al.*, 1982).

Sendo assim, no presente trabalho, utilizamos populações celulares enriquecidas de macrófagos e células dendríticas. Nas culturas de células dendríticas observamos um baixo percentual de células CD14 positivas, aliado ao alto percentual de células DC-SIGN positivas, enquanto que nas culturas de macrófagos verificamos um alto percentual de células CD14 positivas e um percentual extremamente baixo de células expressando o marcador DC-SIGN, confirmando o enriquecimento das populações escolhidas para o estudo.

Neste contexto, a expressão de moléculas de superfície, como CD14, B7.1 (CD80) e DC-SIGN (CD209), nos macrófagos e células dendríticas frente a conídios de *P. lilacinus* foi investigada, por citometria de fluxo, após interação do fungo com as APCs, na concentração de 1:1, por 24 horas. Nesse experimento utilizamos somente essa concentração de conídio:APC, pois não observamos diferenças significativas nos experimentos de interação com as concentrações analisadas anteriormente.

Não observamos nenhuma diferença na expressão de CD14 nos macrófagos na presença e ausência do fungo. Estudos prévios demonstraram o envolvimento de CD14 na ativação de monócitos por hifas de *A. fumigatus* (Wang *et al.*, 2001) e que a adesão entre monócitos humanos e conídios de *Pe. marneffe* foi inibida quando tratados com anticorpos anti-CD14 (Srinoulprasert *et al.*, 2009). Por outro lado, é interessante ressaltar o achado de expressão gênica negativa para CD14 na investigação sobre genes que codificam proteínas de membrana, envolvidas em adesão e fagocitose do fungo *Pa. brasiliensis*. Os autores interagiram macrófagos alveolares da linhagem MHS com célula leveduriforme e frações de parede celular desse fungo, por 24 horas, e demonstraram expressão gênica negativa ou não apresentaram alteração quando foram utilizadas frações de parede da fase filamentosa e da fase leveduriforme, respectivamente (Gonçalves, 2010).

Em relação ao marcador B7.1 observamos um maior percentual de macrófagos expressando B7.1 quando na presença de *P. lilacinus* quando comparados com os mesmos na ausência do fungo. Esses dados, mostrando o aumento do percentual dessas células positivas para esse marcador frente a células fúngicas, estão de acordo com a literatura. É provável que antígenos do fungo que apresentem PAMPs induzam as APCs a expressarem co-estimuladores B7.1. Estudo sobre o aumento da regulação dessa molécula em camundongos sensibilizados com *A. fumigatus* demonstraram aumento do percentual de células B pulmonares e macrófagos expressando CD80 e CD86 nos animais sensibilizados com o antígeno do fungo e sugeriram que essa estimulação pode contribuir para o aumento de células T, principalmente as que produzem citocinas do tipo Th2 (Barrios *et al.*, 2005).

Outra molécula que avaliamos foi a DC-SIGN, e verificamos que houve um expressivo aumento do percentual de macrófagos expressando essa molécula (45,8%) na presença do fungo. Resultados semelhantes foram encontrados por Ngaosuwankul *et al.* (2008) demonstrando o aumento do perfil de expressão desse marcador em macrófagos derivados de monócitos humanos após estimulação com células leveduriformes de *Pe. marneffe* utilizando a tecnologia de microarranjo de DNA. Outro estudo sugere que a molécula DC-SIGN media a adesão e internalização de conídios de *A. fumigatus* por macrófagos e células dendríticas (Serrano-Gómez *et al.*, 2004).

Similarmente ao observado com macrófagos, em nosso estudo, não houve diferença na expressão de CD14 nas DCs na presença ou ausência de conídios de *P. lilacinus*.

Para o marcador B7.1, as DCs na ausência do fungo apresentaram um percentual médio de 54,3% de células expressando esse marcador e em contato com *P. lilacinus* houve um aumento discreto para 61,7%. Uma vez que foi alta a expressão desse marcador nas DCs na ausência do fungo, não podemos avaliar se este discreto aumento tem alguma importância no desencadeamento de uma resposta imune efetora. No entanto, é plausível supor que esse fungo seja capaz de estimular a expressão dessa molécula que tem o papel co-estimulatório na ligação entre as DCs e os linfócitos T, participando, segundo a literatura, na definição da resposta efetora contra antígenos fúngicos, como os de *Pa. brasiliensis* (Sato, 2010). A expressão de B7.1 foi observada quando conídios de *A. fumigatus*, mortos pelo calor, foram postos em contato com DCs (Graziutti *et al.*, 2001). Em contraste, a

diminuição da expressão de CD80 em DCs de camundongos infectados por células leveduriformes de *Pa. brasiliensis* já foi relatada Ferreira (2003).

Em relação ao marcador DC-SIGN, estudado aqui, verificamos que quando as DCs interagiram com *P. lilacinus* houve um aumento do percentual dessas células expressando esse marcador (43,7%) em relação às células na ausência do fungo (32,4%), o que nos leva a atribuir esse aumento a presença dos conídios. A literatura cita que o papel de DC-SIGN na captura de conídios de *A. fumigatus* por DCs humanas e a detecção desse mesmo marcador em macrófagos alveolares fortalecem o papel do mesmo na captura fúngica e sugere sua participação nos estágios iniciais de aspergiloses invasivas e no desenvolvimento de infecções pulmonares fúngicas em hospedeiros debilitados imunologicamente (Serrano-Gómez *et al.*, 2004). Estudos anteriores têm demonstrado correlação de aumento da expressão de DC-SIGN na superfície de DCs com a ligação e a internalização de conídios de *A. fumigatus* (Serrano-Gómez *et al.*, 2004) e de fungos queratinofílicos (Serrano-Gómez *et al.*, 2005). Além disso, DC-SIGN reconhece carboidratos com manose e oligossacarídeos  $Ca^{2+}$ -dependentes na superfície de vários patógenos, como *C. albicans*, *A. fumigatus* e *Chrysosporium tropicum* e admite-se que o DC-SIGN mediará a captação dos fungos, internalizando antígenos por endocitose, além de mediar a adesão intercelular, reconhecendo moléculas endógenas, como ICAM-2 na superfície das células endoteliais e ICAM-3 na das células T selvagens (revisito por Criado *et al.*, 2011). Entretanto, a função do DC-SIGN na resposta imune aos fungos ainda não tem sido amplamente estudada.

Além da expressão dos marcadores celulares nos macrófagos e células dendríticas nós avaliamos, também, a secreção das citocinas IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  por estas células na presença do fungo.

Os nossos dados mostram que conídios de *P. lilacinus* foram capazes de estimular macrófagos e células dendríticas a secretarem IL1- $\beta$ . Resultados semelhantes foram obtidos por Vieira (2008) para macrófagos humanos interagindo com conídios de *F. solani*. Entretanto, dependendo da fase morfológica do patógeno fúngico a indução da expressão de citocinas pode variar. Por exemplo, conídios latentes de *A. fumigatus* não induzem a expressão de várias citocinas e quimiocinas, entre elas IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , diferentemente da hifa (Loeffler *et al.* 2009). Estimulação de IL1- $\beta$  em fagócitos humanos e murinos por fungos filamentosos tem sido investigada por RT-PCR para diferentes citocinas. Os autores demonstraram que mRNA para IL1- $\beta$  foi fortemente induzido em monócitos frente hifas de *A. fumigatus* e *Scedosporium prolificans* e células leveduriformes de *Pe. marneffeii*, sugerindo que esses fagócitos contribuem para a produção de citocinas durante uma infecção fúngica invasiva (Wang *et al.*, 2001; Ngaosuwanikul *et al.*, 2008). Em relação às células dendríticas Sato *et al.* (2010) não obtiveram níveis detectáveis de IL-1 $\beta$  quando células dendríticas de pacientes com paracoccidiodomicose e de indivíduos saudáveis foram deixadas em culturas. Por outro lado, Stockmann-Juvala *et al.* (2008) verificaram que fumosina, micotoxina com efeitos tóxicos e carcinogênicos em animais, produzida por *Fusarium verticillioides*, inibiu a produção de citocinas por células dendríticas, entre elas a IL-1 $\beta$ , e concluíram que essa micotoxina pode ter um impacto na expressão de citocinas e quimiocinas em DCs humanas.

A análise da secreção da citocina TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, aqui realizada, demonstrou que, no tempo de 6 horas de interação, os valores médios detectados foram muito baixos. Como os macrófagos na ausência do fungo apresentaram níveis altos de TNF- $\alpha$ , o que não era esperado, mais experimentos *in vitro* são necessários para avaliarmos a secreção desta citocina. Como as DCs não produziram TNF- $\alpha$ , tanto na presença quanto na ausência do fungo, é possível que nas células dendríticas conídios de *P. lilacinus* não induzam a a produção dessa citocina. Ao contrário do que foi verificado nesse estudo, conídios de *F. solani* aumentaram expressivamente a produção de TNF- $\alpha$  de macrófagos humanos, porém com o decorrer da infecção, após 24 horas de incubação, os níveis dessa citocina começaram a decrescer (Vieira 2008). *A. fumigatus* é capaz de induzir ou não a expressão de TNF- $\alpha$ , dependendo da fase morfológica que interage com fagócitos (Loeffler et al. 2009). Outros fatores como o perfil genético do hospedeiro também pode influenciar na produção de citocinas, afirmação essa demonstrada por Calich & Kashino (1998) após investigação da produção de citocinas por camundongos resistentes e sensíveis a infecção por *Pa. brasiliensis*. Esses autores verificaram que macrófagos peritoneais de camundongos B10.A (sensíveis ao fungo) secretaram altos níveis de TGF- $\beta$  e baixos níveis de TNF- $\alpha$  quando desafiados com células leveduriformes do fungo, diferente dos macrófagos de camundongos A/Sn (resistentes) que liberaram altos níveis de TNF- $\alpha$  associado com uma pequena produção de TGF- $\beta$ .

No tempo de 24 horas de interação dos macrófagos com os conídios, assim como para as células dendríticas, os valores obtidos foram considerados muito baixos, e também para as células sem estímulo, para inferir ao fungo a

causa da inibição ou não estimulação da secreção de TNF- $\alpha$ , sendo necessários novos ensaios.

O presente estudo da interação *in vitro* do fungo oportunista, emergente, *P. lilacinus*, um dos agentes causais da hialohifomicose, com células apresentadoras de antígenos humanas (macrófagos e células dendríticas) amplia os conhecimentos acerca de sua capacidade invasiva e de estimulação de moléculas importantes na resposta imune do hospedeiro, até o momento desconhecida. Adicionalmente, visa chamar a atenção da comunidade científica acerca da sua virulência e estimular maiores estudos sobre a epidemiologia da doença, patogênese e inter-relação com o hospedeiro.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados da análise da interação *in vitro* do fungo *Paecilomyces lilacinus*, agente causal da hialohifomicose, com células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas, ambas derivados de monócitos isolados de sangue periférico humano) permitem concluir:

- A análise morfológica do isolado de *P. lilacinus* proveniente de paciente com hialohifomicose de seio nasal apresentou características típicas da espécie;
- A interação de conídios do isolado de *P. lilacinus* com macrófagos e células dendríticas (APCs) de doadores saudáveis demonstrou que o fungo é capaz de infectar, de modo semelhante, ambas as células;
- O tempo de 6 horas de interação foi o melhor para a análise quantitativa, visto que neste momento os conídios encontravam-se internalizados, delimitados por vacúolos e muitos já dilatados no interior das APCs.
- A concentração de 1:1 (conídio/APCs) foi a melhor proporção entre as células para avaliar o processo de internalização do fungo e as etapas da infecção, mostrando que os conídios no interior das APCs são capazes de se dilatar, formar tubos germinativos, hifas septadas e micélio, destruindo as células humanas em 24 horas de interação;



- A presença de L-Name na interação do isolado de *P. lilacinus* com as APCs, demonstrou que não houve alteração no processo de desenvolvimento do fungo no interior das células humanas, sugerindo que os mecanismos oxidativos, relacionados ao óxido nítrico, da resposta celular, especificamente, frente a esse fungo parecem não ser eficientes para a degradação de suas células ou não são produzidos durante essa infecção;
- A interação de conídios de *P. lilacinus* com a população enriquecida de macrófagos demonstrou que a infecção estimulou o aumento do percentual de células positivas para a molécula co-estimulatória B7.1 e da molécula DC-SIGN indicando a presença de processos metabólicos de ativação para a apresentação do antígeno;
- Na população enriquecida de células dendríticas o aumento do percentual do marcador B7.1 foi semelhante na ausência e presença do fungo. Por outro lado, foi significativo o aumento do percentual de DCs expressando o marcador DC-SIGN na presença de *P. lilacinus*, sugerindo o papel importante dessas células na captura de seus conídios;
- Os conídios de *P. lilacinus* foram capazes de estimular a secreção da citocina IL1- $\beta$  pelos macrófagos e células dendríticas, e é possível que eles tenham inibido a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, mas novos ensaios deverão ser realizados para a confirmação dos resultados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, AK; Lichman, AH; Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2008.

Antas PRZ, Brito MMS, Peixoto E, Ponte CGG, Borba CM. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* focusing in disease burden, *in vitro* antifungal susceptibility and management. *Microbes and Infect*. 2012; 14(1): 1-8.

Araújo JM, Braga FR, Araújo JV, Carvalho RO. Activity of nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Dipylidium caninum* egg capsules. *Rev Inst Adolfo Lutz (Impr)*. 2009; 68(3):488-491.

Atkins SD, Clark IM, Pande S, Hirsch PR, Kerry BR. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005; 51(2):257-264

Barrios CS, Johnson BD, Henderson JD, Jr, Fink JN, Kelly KJ, Kurup VP. The coestimulatory molecules CD80, CD86 and OX40L are up-regulated in *Aspergillus fumigatus* sensitized mice. Clin Exp Immunol. 2005; 142(2):242-250.

Blackwell V, Ahmed K, O'Docherty C, Hay RJ. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant patient. Br Dermatol. 2000; 143(4):873-877.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998; 392(6673):245-252.

Brieland JK, Jackson C, Menzel F, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Halpern J, et al. A. Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun. 2001; 69(3): 1554-1560.

Blasi E, Pitzurra L, Puliti M, Chimienti AR, Mazzolla R, Barluzzi R, Bistoni F. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. Infect Immun. 1995; 63(5):1806–1809.

Bozza S, Gaziano R, Spereca A, Bacci A, Montagnoli C, Di Francesco P, Romani L. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol.* 2002; 168(3):1362-1371.

Brakhage AA, Bruns S, Thywissen A, Zipfel PF, Behnsen J. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(4):409-415.

Calich VLG, Kashino SS. Cytokine produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(5):615-623.

Carey J, D'Amico R, Sutton DA, Rinaldi MG. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(9):1155-1158.

Castro LGM, Salebian A, Sotto MN. Hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in renal transplant patient and a review of human *Paecilomyces* species infections. *J Med. Vet. Mycol.* 1990; 28(1):15-26.

Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Alves CDF. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol.* 2010; 169(1-2):123–127.

Centeno-Lima S, Silveira H, Casimiro C, Aguiar P, Rosário VE. Kinetics of cytokine expression in mice with invasive aspergillosis lethal infection and protection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; 32(2):167-173.

Chung PC, Lin HC, Hwang YS, Tsai YJ, Ngan KW, Huang SC, Hsiao CH. *Paecilomyces lilacinus* scleritis with secondary keratitis. *Cornea.* 2007; 26(2): 232-234.

Ciecko SC, Scher R. Invasive fungal rhinitis caused by *Paecilomyces lilacinus* infection: report of a case and a novel treatment. *Ear Nose Throat J.* 2010; 89(12):594-595.

Coelho JG. Papel da célula dendrítica na resposta imune celular específica ao *Mycobacterium leprae*. Monografia- Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro; 2009.

Cogliati M, Roverselli A, Boelaert J, Taramelli D, Lombardi L, Viviani MA. Development of an *in vitro* macrophage system to assess *Penicillium marneffe* growth and susceptibility to nitric oxide. *Infect Immun*. 1997; 65(1):279-284.

Criado PR, Oliveira CB, Dantas KC, Takiguti FA, Benini LV, Vasconcellos C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. *An. Bras. Dermatol*. 2011; 86(4):726-731.

Deng SX, Kamal KM, Hollander DA. The Use of Voriconazole in the management of post-penetrating keratoplasty *Paecilomyces* keratitis. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2009; 25(2):175-177.

Djeu, JY. Modulators of immune responses to fungi. In: Murphy JW, Friedman H, Bendinelli M, editors. *Fungal infections and immune responses*. New York: Plenum Press; 1993. p521–532.

Ferreira KS. Modulação da ativação de células dendríticas por *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese- Universidade de São Paulo. São Paulo; 2003.

Ford JG, Agee S, Greenhaw ST. Successful medical treatment of a case of *Paecilomyces lilacinus* keratitis. *Cornea*. 2008; 27(9):1077-1079.

Gafa V, Remoli ME, Giacomini E, Gagliardi MC, Lande R, Severa M, Grillot R, Coccia EM. In vitro infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. *Microbes Infect*. 2007; 9(8): 971-980.

Garbino J, Ondrusova A, Baligvo E, Lew D, Bouchuiguir-Wafa K, Rohner P. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* endophthalmitis with voriconazole. *Scand J Infect Dis*. 2002; 34(9): 701-703.

Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000; 100(5):575-585.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010; 327(5966):656-661.

Goihman-Yahr M, Pine L, Alborno MC, Yarzabal L, Gómez MH, San Martín B, Ocanto A, *et al.* Studies on planting efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*.1980; 71(2): 73-83.

Gonçalves LMB. Análise da expressão de genes em macrófagos durante um cinética com o *Paracoccidioides brasiliensis*. Brasília. Tese - Universidade de Brasília; 2010.

Gonzalez GM, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG, Loebenberg D. *In vitro* activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med. Mycol.* 2005;43(3): 281-284.

Gordon MA. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, from systemic infection in an armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Sabouraudia*.1984; 22(2):109-116.

Gottlieb T, Atkins BL. Case report. Successful treatment of cutaneous *Paecilomyces lilacinus* infection with oral itraconazole in an immune competent host. *Mycoses*. 2001; 44(11-12):513-515.



Gucalp R, Carlisle P, Gialanella P, Mitsudo S, McKittrick J, Dutcher J. *Paecilomyces* sinusitis in an immunocompromised adult patient: case report and review. Clin Infect Dis. 1996; 23(2):391-393.

Gunasekera TS, Holland RJ, Gillings MR, Briscoe DA, Neethling DC, Williams KL, Nevalainen KMH. Phenotypic and genetic characterization of *Paecilomyces lilacinus* strains with biocontrol activity root-knot nematodes. Can J Microbiol. 2000; 46(9):775-783.

Gutiérrez-Rodero F, Moragón M, Ortiz de la Tabla V, Mayol MJ, Martín C. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host successfully treated with itraconazole: Case Report and Review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18(11):814–818.

Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, Durack DT. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. J. Clin. Invest. 1988; 81(4):1129–1136.

Grazziutti M, Przepiorka D, Rex JH, Braunschweig I, Vadhan-Raj S, Savary CA.

Lymphocyte stimulation: Dendritic cell-mediated stimulation of the *in vitro* lymphocyte response to *Aspergillus*. Bone Marrow Transplant. 2001; 27(6):647–652.

Hall VC, Goyal S, Davis MDP, Walsh JS. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*: report of three cases and review of literature. Int J Dermatol. 2004; 43(9):648-653.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals reactive species and toxicology. Free Radicals in Biology and Medicine. 1999; 77(3):544-616.

Heard DJ, Cantor GH, Jacobson ER, Purich B, Ajello L, Padhye AA. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* in an Aldabra tortoise. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1989; 189(9):1143-1145.

Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, *et al.* Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. Immunol Rev. 2004; 199(1):9-26.

Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2002; 100(13): 4521-4527.

Hofling-Lima AL, Forseto A, Duprat JP, Andrade A, Souza LB, Godoy P, Freitas D. Laboratory study of the mycotic infectious eye diseases and factors associated with keratitis. *Arq Bras Oftalmol*. 2005; 68(1):21-27.

Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(4):465-472.

Hong S, Jeong H, Chung H, Kim H, Chae H, Shin T, *et al*. An herbal formula, herbkines, enhances cytokines production from immune cells. *J Ethnopharmacol*. 2005; 98(1-2):149-155.

Houbraken J, Verweij PE, Rijs AJMM, Borman AM, Samson RA. Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings, *J Clin Microbiol*. 2010; 48(8): 2754-2761.

Huang CY, Sun PL. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* successfully treated by oral voriconazole and nystatin packing. *Mycopathologia*. 2011; 172(2):141-5.

Inglis PW, Tigano MS. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genet Mol Biol*. 2006; 29(1):132-136.

Innocenti P, Pagani E, Vigi D, Hopfl R, Huemer HP, Larcher C. Persisting *Paecilomyces lilacinus* nail infection following pregnancy. *Mycoses*. 2011; 54(6):880-882.

Ishimine, T., Kawakami K, Nakamoto A, Saito A. Analysis of cellular response and gamma interferon synthesis in bronchoalveolar lavage fluid and lung homogenate of mice infected with *Pneumocystis carinii*. *Microbiol Immunol*. 1995; 39(1):49-58.

Jackson ST, Smikle MF, Antoine MG, Roberts GD. *Paecilomyces lilacinus* fungemia in a Jamaican neonate. *West Indian Med. J*. 2006; 55(5):361.

Jorens PG, Boelaert JR, Halloy V, Zamora R, Schneider YJ, Herman AG.

Human and rat macrophages mediate fungistatic activity against *Rhizopus* species differently: *in vitro* and *ex vivo* studies. *Infect Immun.* 1995; 63(11):4489–4494.

Ko WT, Kim SH, Suh MK, Ha GY, Kim JR. A case of localized skin infection due to *Paecilomyces lilacinus*. *Korean J Dermatol.* 2007; 45(9):930-933.

Kudeken N, Kawakami K, Kusano N, Saito A. Cell-mediated immunity in host resistance against infection caused by *Penicillium marneffeii*. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34(6):971-978.

Kurzai O, Vaeth T, Hamelmann W, Müller FMC, Klinker H, Langmann P, Frosch M, Mühlischlegel F. Combined surgical and antifungal treatment of a subcutaneous infection due to *Paecilomyces lilacinus*. *Med Mycol.* 2003; 41(3):253-258.

Lane TE, Otero GC, Wu-Hsieh BA, Howard DH. Expression of inducible nitric oxide synthase by stimulated macrophages correlates with their antihistoplasma activity. *Infect Immun.* 1994; 62(4):1478–1479.

Latgé J. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(2):310-350.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults. Cell. 1996; 86(6):973-983.

Li XL, Zhang CL, Fang WH, Lin FC, White-spot disease of chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinens*) caused by *Paecilomyces lilacinus*. J Zhejiang Univ Sci. 2008; 9(7):578-581.

Lin WL, Lin WC, Chiu CS. *Paecilomyces lilacinus* cutaneous infection associated with peripherally inserted central catheter insertion. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2008; 22(10):1267-1268.

Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. Microbiol Infect Dis. 1998; 109(1): 45-54.

Loeffler J, Haddad Z, Bonin M, Romeike N, Mezger M, Schumacher U, *et al.*  
Interaction analyses of human monocytes cocultured with different forms of  
*Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol. 2009; 58(Pt 1):49–58.

Lott ME, Sheehan DJ, Davis LS. *Paecilomyces lilacinus* infection with a  
sporotrichoid pattern in a renal transplant patient. J Drugs Dermatol. 2007;  
6(4):436-439.

Luangsa-ard JJ, Houbraken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-  
Jones NL, Samsom RA. *Purpureocillum*, a new genus for the medically  
important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiol Lett. 2011;321(2):141-149.

Maier AKB, Reichenbach A, Rieck P. *Paecilomyces lilacinus* Keratitis.  
Ophthalmologie. 2011; 108(10):966–968.

Malecha MA, Tarigopula S, Malecha MJ. Successful treatment of *Paecilomyces*  
*lilacinus* keratitis in a patient with a history of herpes simplex virus keratitis.  
Cornea. 2006; 25(10):1240-1242.

Martin CA, Roberts S, Greenberg RN. Voriconazole treatment of disseminated *Paecilomyces* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clinic Infect Dis.* 2002; 35(7): e78-e81.

Maslen M, Whitehead J, Forsyth WM, McCracken H, Hocking AD. Systemic mycotic disease of captive crocodile hatchling (*Crocodylus porosus*) caused by *Paecilomyces lilacinus*. *J Med Vet Mycol.*1988; 26(4):219-225.

Mazet I, Pendland J, Boucias,D. Comparative analysis of phagocytosis of fungal cells by insect hemocytes versus horse neutrophils. *Dev Comp Immunol.* 1994; 18(6):455–466.

Michaliszyn E, Sénéchal S, Martel P, Repentigny L. Lack of involvement of nitric oxide in killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages. *Infect Immun.*1995; 63(5): 2075–2078.

Miyazaki M, Horii T, Hata K, Watanabe NA, Nakamoto K, Tanaka K, *et al.* *In vitro* activity of E1210, a novel antifungal, against clinically important yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10):4652-4658.



Motswaledi HM, Mathekga K, Sein PP, Nemutavhanani DL. *Paecilomyces lilacinus* eumycetoma. *Int J Dermatol*. 2009; 48(8):858-861.

Muller H, Cikirikcioglu M, Lerch R. Subaortic aneurysm caused by *Paecilomyces lilacinus* endocarditis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008; 101(11-12):803-804.

Murciano A, Domer J, Cohen I. *Paecilomyces lilacinus* infection in an immunocompromised patient. *J La State Med Soc*. 1990; 142(12):35-37.

Nakamura LT, Wu-Hsieh BA, Howard DH. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1994; 62(2):680-684.

Ngaosuwankul P, Pongtanalert P, Engering A, Chaiyaroj AC. Differential gene expression profiles of human monocyte-derived antigen presenting cells in response to *Penicillium marneffe*: Roles of DC-SIGN (CD209) in fungal cell uptake. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2008; 26(2-3):151-163.

Nobel Lectures. Physiology or Medicine. Amsterdam: Elsevier Publishing Company; 1967. p.1901–1921.

Noverr MC, Lindell DM, Toews GB, Huffnagle GB. Fungal interactions with leukocytes. In: Heitman J; Filler SG; Edwards JE; Mitchell AP. Molecular principles of fungal pathogenesis, ASM Press, Washington DC, 2006. p. 555-563.

Oliver M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(2):293-305.

Orth B, Frei R, Itin PH, Rinaldi MG, Speck B, Gratwohl A, Widmer AF. Outbreak of invasive mycoses caused by *Paecilomyces lilacinus* from a contaminated skin lotion. Ann Intern Med. 1996; 125(10):799-806.

Ounissi M, Abderrahim E, Trabelsi S, Khaled S, Bezzine H, Hamida FB, *et al.* Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus* after kidney transplantation. Transplant. 2009; 41(7):2917-2919.

Pawloski DR, Brunker JD, Singh K, Sutton DA. Pulmonary *Paecilomyces lilacinus* infection in a cat. J Am Anim Hosp Assoc. 2010; 46(3):197-202.

Pastor FJ, Guarro J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infection. Clin. Microbiol Infect 2006; 12(10):948-960.

Peakman M, Vergani D. Imunologia básica e clínica. 1ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1999.

Pfaler MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concerns for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2004; 42(10):4419-4431.

Peixoto E, Oliveira JC, Antas PRZ, Borba CM. *In vitro* study of the host-parasite interactions between mouse macrophages and the opportunistic fungus *Paecilomyces lilacinus*. Ann Trop Med Parasitol. 2010; 104(6):529-534.

Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. Clin Infect Dis. 1996; 22(Suppl 2):S112-118.

Perkhofer S, Speth C, Dierich MP, Lass-Flörl C. *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing of *Aspergillus* species by mononuclear phagocytes. *Mycopathologia*. 2007; 163(6):303-307.

Permi HS, Kumar S, Karnaker VK, Prasad K, Teerthanath S, Bhandary SK. A rare case of fungal maxillary sinusitis due *Paecilomyces lilacinus* in an immunocompetent host presenting as a subcutaneous swelling. *J Lab Physicians*. 2011; 3(1):46-48.

Pintor E, Martín M, García P, González M. Endophthalmitis due to *Paecilomyces lilacinus* after non-surgical penetrating trauma. *Enferm Infecc Microbiol Clín*. 2001; 19(17):347-348.

Pinheiro L, Castro HC, Bernardino A, Rangel CR, Bourguignon SC, Santos DO. Searching for new antileishmanial lead drug candidates: Synthesis, biological and theoretical evaluations of promising thieno[2,3-b]pyridine derivatives. *J Microbiol Antimicrob*. 2012; 4(1): 32-39.

Prabhu S, Kumar S, Subramanian S, Senthil K. Mass production and commercial formulation of *Paecilomyces lilacinus*. *Indian J. Nematol*. 2008; 32(2):350-358.

Riedell RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. 1950; 42(2):265-70.

Robertson M, Seaton A, Milne LJR, Raeburn JA. Resistance of spores of *Aspergillus fumigatus* to ingestion by phagocytic cells. *Thorax*. 1987; 42(2):466-472.

Roilides E, Lyman CA, Sein T, Petraitiene R, Walsh TJ. Macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis and oxidative burst of mononuclear phagocytes against *Penicillium marneffe* conidia. *Immunol Med Microbiol*. 2003; 36(1-2):19-26.

Rongrungruang Y, Levitz S. Interactions of *Penicillium marneffe* with human leukocytes *in vitro*. *Infect Immun*. 1999; 67(9):4732-4736.

Rosmaninho A, Torres T, Velho G, Lopes V, Amorim I, Selores M. *Paecilomyces lilacinus* in transplant patients: an emerging infection. *Eur. J. Dermatol*. 2010; 20(5):643-644.

Rosser EJ. Cutaneous paecilomycosis in a cat. J Am Anim Hosp Assoc. 2003;39(6):543-546.

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J Exp Med. 1995; 182(2):283-288.

Samson RA. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. Stud Mycol. 1974.

Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JÁ, Defruyt M, Lorré K, Van Heuverswyn H. Evaluation of B7-1 (CD80) e B7-2 (cD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. Nihon hansenbyo Gakkai. 2001; 70(1): 15-24.

Santos DO, Miranda A, Suffys P, Rodrigues CR, Bourguignon SC, Castro HC. Current understanding of the role of dendritic cells and their co-stimulatory molecules in generating efficient T cell responses in lepromatous leprosy. Curr Immunol Rev. 2007; 3(1):1-9.

Santos DO, Van Heuverswyn H, Nery JÁ, Bourguignon SC, Castro HL, Ragel, CR, Miranda A. Expression of B7-1 costimulatory molecule in Lepromatous leprosy and reactional episodes. *Clin Exp Dermatol.* 2007; 32(1): 75-80.

Sato PK. Estudo de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose: Expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas. Tese - Universidade de São Paulo. São Paulo; 2010.

Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective Protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*; observations on these two lines of defense *in vivo* and *in vitro* with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest.* 1982; 69(3):617-631.

Schaffner, A, Douglas H, Braude AI, Davis CE. Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophages. *Infect Immun.* 1983; 42(3):1109-1115.

Schooneveld VT, Freifeld A, Lesiak B, Kalil A, Sutton DA, Iwen PC. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis.* 2008; 10(2):117-122.

Serrano-Gómez D, Dominguéz-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbí A.L. Macrophages *fumigatus* conidia by dendritic cells and binding and internalization of *Aspergillus* molecule 3-grabbing nonintegrin mediates. J Immunol. 2004; 173(9):5635-5643.

Serrano-Gómez D, Leal JA, Corbí AL. DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophylic fungi by human dendritic cells. Immunobiology. 2005; 210(2-4):175-183.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol. 2002; 2(3):151-161.

Silliman CC, Lawellin DW, Lohr JA, Rodgers BM, Donowitz LG. *Paecilomyces lilacinus* infection in a child with chronic granulomatous disease. J Infect. 1992; 24(2):191-195.

Sisto F, Miluzio A, Leopardi O, Mirra M, Boelaert JR, Taramelli D. Differential cytokine pattern in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffe*: Protective role of gamma interferon. Infect Immun. 2003;71(1): 465-473.



Souza, MA. Avaliação da produção *in vitro* de citocinas e de óxido nítrico na leishmaniose tegumentar americana ativa e após cura clínica. Tese - Fundação Oswaldo Cruz. Recife; 2010.

Srinoulprasert Y, Pongtanaalert P, Chawengkirttikul R, Chaiyaroj SC. Engagement of *Penicillium marneffe* conidia with multiple pattern recognition receptors on human monocytes. *Microbiol Immunol*. 2009; 53(3):162-172.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991; 9: 271-296

Stockmann-Juvala H, Alenius H, Savolainen K. Effects of fumonisin B(1) on the expression of cytokines and chemokines in human dendritic cells. *Food Chem. Toxicol*. 2008; 46(5):1444-1451.

Tan TQ, Ogden AK, Tillman J, Demmler GJ, Rinaldi MG. *Paecilomyces lilacinus* catheter-related fungemia in an immunocompromised pediatric patient. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(9):2479-2483.

Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J. Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine (Baltimore)*. 1983; 62(5):286-309.

Tortora, GJ.; Berdell FR, Case CL. *Microbiologia*. 6ªed. Porto Alegre:Editora Artmed; 2000.

Van Schooneveld T, Freifeld A, Lesiak B, Kalil A, Sutton DA, Iwen PC. *Paecilomyces lilacinus* infection in a liver transplant patient: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis*. 2008; 10(2):117-122.

Vartivarian SE, Anassie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. *Clin Infect Dis*. 1993; 17(Suppl 2):S487-491.

Viaro F, Évora PRB. Expressão das óxido nítrico sintetases na vasculopatia coronariana do transplante cardíaco. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2000; 15(1):55-65.

Vieira RT. Interação de *Leishmania amazonensis*, *Mycobacterium leprae* e *Fusarium solani* com macrófagos humanos – papel do óxido nítrico e derivados sintéticos de piridinas. Dissertação- Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro; 2008.

Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis*. 1999; 1(4):247-261.

Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10(Suppl. 1):48-66.

Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jorgensen PF, Flo TH, Espevikt T, *et al*. Involvement of CD14 and Toll-Like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun*. 2001; 69(4):2402–2406.

Washburn RG, Gallin JI, Bennett JE. Oxidative killing of *Aspergillus fumigatus* proceeds by parallel myelo peroxidase-dependent and -independent pathways. *Infect Immun*. 1987; 55(9):2088-2092.

Wessolossky M, Haran JP Bagchi K. *Paecilomyces lilacinus* olecranon bursitis in an immunocompromised host: case report and review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61(3):354-357.

Wilkins-Rodriguez AA, Escalona-Montano AR, Aguirre-Garcia M, Becker I, Gutierrez-Kobeh L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Exp Parasitol.* 2010; 126(3):426-434.

Williamson PR, Kwon-Chung KJ, Gallin JI. Successful treatment of *Paecilomyces variotii* infection in a patient with chronic granulomatous disease and review of *Paecilomyces* species infections. *Clin Infect Dis.* 1992; 14(5):1023-1026.

Winn RM, Gil-Lamaignerer C, Maloikou AVGI, Roilides E. The Eurofung Network. Interactions of human phagocytes with mould *Fusarium* spp. and *Verticillium nigrescens* possessing different pathogenicity. *Med Mycol.* 2003; 41(6):503-509.

Wu PC, Lai CH, Tan HY, Ma DH, Hsiao CH. The successful medical treatment of a case of *Paecilomyces lilacinus* keratitis. *Cornea*. 2010; 27(3): 357-358.

Yuan X, Wilhelmus KR, Matoba AY, Alexandrakis G, Miller D, Huang AJ. Pathogenesis and outcome of *Paecilomyces keratitis*. *Am J Ophthalmol*. 2009; 147(4):691-696.

Zendri E, Martignoni G, Benecchi M, Fanti F, Panfilis G. *Paecilomyces lilacinus* cutaneous infection associated with a dog bite. *J Am Acad Dermatol*. 2006; 55(Suppl 2):S63-64.